

Aus der Abteilung für Neurogenetik

(Leiter: Prof. K.-A. Nave, Ph.D)

des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin

in Göttingen

**Konditionale Inaktivierung von *Pten* in einem neuen
Mausmodell für tomaculöse Neuropathien**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jan Hendrik Oltrogge
aus
Alfeld (Leine)

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Mikael Simons

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Jutta Gärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Entwicklung und Funktion der Schwannzelle	1
1.1.1	Stadien der Schwannzellentwicklung	1
1.1.2	Bildung von Myelin	4
1.1.3	Signalwege bei der Myelinisierung	5
1.2	Der Tumorsuppressor PTEN	10
1.2.1	PTEN als Regulator des PI3-Kinase-Signalwegs	12
1.2.2	PTEN in der Polarisierung und Migration von Zellen	12
1.2.3	PTEN-assoziierte Erbkrankheiten	13
1.3	Hereditäre Neuropathien des peripheren Nervensystems	13
1.3.1	Hereditäre Neuropathien mit fokalem Myelinwachstum	14
1.4	Zielsetzung und Hypothese	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien und Bioreagenzien	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial	18
2.1.3	Geräte	19
2.1.4	Lösungen und Puffer	20
2.1.5	Enzyme	23
2.1.6	Reaktionskomplettsysteme	24
2.1.7	Nukleinsäuren und Nukleotide	24
2.1.8	Oligonukleotide	24
2.1.9	Antikörper	24
2.1.10	Versuchstiere	25
2.1.11	Software	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Analyse von Versuchstieren	26
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.4	Histologische Methoden	31
2.2.5	Morphometrische Analysen	35
2.2.6	Statistische Methoden	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Herstellung der Pten-Mutanten	37
3.1.1	Nachweis von Rekombination in genomischer DNA	38
3.1.2	Reduktion von PTEN und Aktivierung des PI3K-Signalwegs	39
3.2	Analyse des Phänotyps der Pten-Mutante	41

3.2.1	Vergrößerung des betroffenen Gewebes	41
3.2.2	Erhöhte Anzahl von Schwannzellen	42
3.2.3	Ektopische Myelinisierung von kleinen Axonen	43
3.2.4	Bildung von „Remak-Myelin“	44
3.2.5	Membranwicklungen um Kollagen-Fasern	46
3.2.6	Hypermyelinisierung von Axonen kleiner 2 µm	46
3.2.7	Fokale Hypermyelinisierung und kommaförmige Myelinausstülpungen bei größeren Axonen	48
3.2.8	Lokalisation der Tomacula anliegend an Regionen unkompakten Myelins	50
3.2.9	Anreicherung von phosphoryliertem AKT im unkompakten Myelin und in nicht- myelinisierenden Schwannzellen	51
3.2.10	Unveränderte Verteilung von DLG1 und PAR3 im Myelin der Pten-Mutanten	54
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	56
4	Diskussion	57
4.1	Vorüberlegungen zur Verwendung des Mausmodells	58
4.2	Regulation der Myelinisierung	59
4.2.1	Der PI3K-AKT-Signalweg als Vermittler der Axongröße	59
4.2.2	Entstehung von fokalem Myelinwachstum	60
4.2.3	Zunahme der Tomacula durch anhaltende Aktivität von mTOR	61
4.2.4	Polarisierungsstörung der PTEN-defizienten Schwannzellen	62
4.3	Radial sorting und ektopische Myelinisierung	62
4.4	Inkomplettes Myelin um Remak-Axone (Remak-Myelin)	63
4.5	Die Pten-Mutanten als Neuropathie-Modell	64
4.5.1	Gestörte Phosphoinositid-Homöostase bei der Entwicklung von Myelinausfaltungen	65
4.5.2	Vergleich mit tomaculösen Neuropathien	66
4.6	Schlussfolgerungen und Konsequenzen	67
5	Zusammenfassung	69
6	Abbildungsverzeichnis	70
7	Literaturverzeichnis	71
	Danksagungen	81
	Abstract	83

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen im Text, die abgeleiteten SI-Einheiten (*Système International d'Unités*) entsprechen, werden nicht gesondert aufgeführt.

AKT/PKB	AKT/ <i>protein kinase B</i>
APS	Ammonium-Persulfat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CMT4	Charcot-Marie-Tooth disease type 4
d	Tage
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dpi	<i>dots per inch</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bisaminoethylether-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ErbB	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene B</i>
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNPP	<i>heritary neuropathy with liability to pressure palsies</i>
MAG	<i>Myelin-associated glycoprotein</i>
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mM	<i>monoclonal-mouse</i>
mRb	<i>monoclonal-rabbit</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NRG1	Neuregulin1
PO / MPZ	<i>Myelin protein zero</i>
PBS	Phosphatpuffer in Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pRB	polyclonal-rabbit
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog on chromosome 10</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunden
S6K	S6-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (<i>standard error of the mean</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TIFF
TRIS

tagged image file format
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Das Nervensystem des Menschen setzt sich zusammen aus der Gesamtheit aller Nerven- und Gliazellen. Es hat die Aufgabe, über die Sinnesorgane Informationen aufzunehmen, zu verarbeiten und Reaktionen zu steuern, die eine optimale Interaktion mit der Umwelt ermöglichen.

Anatomisch werden das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und das periphere Nervensystem (PNS), bestehend aus allen übrigen Nerven- und Gliazellen des Körpers, unterschieden.

Gliazellen werden eingeteilt in die Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia des ZNS sowie die Schwannzellen und Satellitenzellen des PNS. Sie erfüllen unter anderem Funktionen zum Schutz und zur Versorgung der Nervenzellen und deren Fortsätzen, den Dendriten und den Axonen. Sie treten dafür in enge Interaktion mit ihren zugehörigen Nervenzellen. Schwannzellen im PNS und Oligodendrozyten im ZNS bilden darüber hinaus die Myelinscheide. Diese besteht im Wesentlichen aus multiplen konzentrischen Schichten von Zellmembran um Axone. Diese Zellmembran ist hochspezialisiert im Hinblick auf ihre Lipid- und Proteinkonzentration. Die Myelinscheide wirkt als Kondensator der axonalen Zellmembran, der die Leitfähigkeit des Axons erhöht und durch die Beschränkung von Aktionspotentialen auf nicht-myelinisierte Bereiche des Axons (Nodien) die saltatorische Fortleitung von Nervenimpulsen ermöglicht. Die Entwicklung der Myelinscheide in der Evolution ermöglichte eine Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit in Verbindung mit einer Verkleinerung des Axondurchmessers.

Die Störung der Schutz- und Versorgungsfunktion der Schwannzelle sowie die Beeinträchtigung der Bildung einer intakten Myelinscheide auf Grund von genetischen Defekten definiert die Gruppe der hereditären peripheren Neuropathien. Die höchste Prävalenz in dieser Gruppe von Erkrankungen hat die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) oder hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (HMSN). Zur Untersuchung der Mechanismen, die von einem spezifischen Gendefekt bis zur klinischen Ausprägung einer Form der CMT führen, wurden verschiedene Tiermodelle generiert (Nave et al. 2007).

1.1 Die Entwicklung und Funktion der Schwannzelle

1.1.1 *Stadien der Schwannzellentwicklung*

Die Schwannzellen entstammen den Neuroepithelzellen des dorsalen Neuralrohrs (Neuralleistenzellen, *neural crest cells*) (Le Douarin et al. 1991). Über die Zwischenstufen des Schwannzell-Vorläufers und der unreifen Schwannzelle entwickeln sie sich zu myelinisierenden

oder nicht-myelinisierenden Schwannzellen. Im Folgenden sollen diese Entwicklungsschritte näher beschrieben werden.

1.1.1.1 Der Schwannzell-Vorläufer

Der Übergang von der Neuralleistenzelle zum Schwannzell-Vorläufer (SCP) markiert den ersten Schritt in der definitiven Entwicklung zur myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Schwannzelle (Jessen und Mirsky 2005). SCP können in der Maus erstmals am 12. und 13. Tag der Embryonalentwicklung (E12/13) gefunden werden. Sie befinden sich als einziger nicht-neuronaler Zelltyp zwischen den Axonen des auswachsenden embryonalen Nerven. Durch ihre fingerartigen Fortsätze sind sie untereinander über *adherens junctions* verbunden. Sie sorgen vermutlich für die kompakte Form und Gewebestabilität des embryonalen Nerven und geben den auswachsenden Axonen trophische Unterstützung (Abbildung 1). Eine Unterscheidung zur Neuralleistenzelle ist *in vivo* durch die Expression verschiedener Markerproteine wie *Myelin protein zero* (P0), *brain fatty acid binding protein* (BFABP) oder Cadherin-19 möglich (Jessen und Mirsky 2005). Die zwei vorherrschenden Zelltypen des embryonalen Nerven, Neurone und SCP, hängen in ihrem Überleben voneinander ab. Die Abwesenheit von SCP in sich entwickelnden Nerven resultiert im Untergang von Neuronen (Riethmacher et al. 1997). SCP ihrerseits brauchen axonale Überlebenssignale. Ein zentrales axonales Signal stellt der Wachstumsfaktor Neuregulin 1 (NRG1) dar. Die Fähigkeit von Axonen, als Überlebensstimulus für SCP zu wirken, kann durch Zugabe eines NRG1-blockierenden Faktors in Kultur inhibiert werden (Dong et al. 1995; Meyer et al. 1997; Wolpowitz et al. 2000). Zudem überleben SCP in Zellkulturen ohne Zusatz von löslichem NRG1 nur durch direkten Kontakt mit Axonen.

Die von NRG1 abhängigen intrazellulären Signalwege der Schwannzelle werden in Abschnitt 1.1.3 näher erläutert.

1.1.1.2 Die unreife Schwannzelle

Die Entwicklung zur zweiten Zwischenstufe, der unreifen Schwannzelle, vollzieht sich ab E15/16 (Dong et al. 1999). In dieser Zeit erreichen die auswachsenden embryonalen Nerven ihr jeweiliges Zielgewebe und bilden mit diesem Synapsen (Wolpowitz et al. 2000). Die Nerv, und mit ihm auch die Schwannzell-Vorläufer, vollziehen eine grundlegende Änderung ihrer Zytoarchitektur. Bindegewebs-Fibroblasten bilden das Endoneurium und Blutgefäße wachsen ein. Interdigitierende unreife Schwannzellen umschließen Bündel von Axonen und bilden sogenannte Axon-Schwannzell-Familien (Webster und Favilla 1984) (Abbildung 1).

Auf Ebene der Proteinexpression geht dieser Übergang beispielsweise mit einer verminderten Expression des Zelladhäsionsmoleküls N-cadherin in den Zellen einher (Wanner et al. 2006).

Mittlerweile ist eine Reihe von Signalmolekülen identifiziert, die den phänotypischen Übergang von SCP in unreife Schwannzellen beeinflussen. In Zellkulturexperimenten stellte sich heraus, dass NRG1, neben seiner Funktion als Überlebenssignal für SCP, *in vitro* einen notwendigen Faktor zur Reifung von SCP in unreife Schwannzellen darstellt. Diese Reifung kann durch *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) beschleunigt werden (Dong et al. 1995; Dong et al. 1999). Endothelin zeigte sich hingegen als Antagonist des NRG1-Signals, indem es SCP überleben lässt und den Übergang von SCP in unreife Schwannzellen verlangsamt (Brennan et al. 2000).

Obwohl schon SCP eine hohe Zellteilungsrate zeigen, erreichen die unreifen Schwannzellen den Höchstwert der Proliferation ab E15. Hierbei induziert der direkte Kontakt mit Axonen die Zellteilung (Salzer et al. 1980). Als mitogene Faktoren wurden axonales NRG1 (Morrissey et al. 1995), sowie *transforming growth factor beta* (TGF- β) (Einheber et al. 1995; Guenard et al. 1995), Laminin 2 und Laminin 8 (Yang et al. 2005; Yu et al. 2005) identifiziert.

Die Anzahl der unreifen Schwannzellen in der Entwicklung wird vermutlich über eine Balance zwischen Überlebens- und Apoptosesignalen reguliert. Proliferations- und Überlebenssignale scheinen in der Schwannzellentwicklung eng verbunden zu sein, da NRG1 und Laminin zusätzlich zu ihren mitogenen Effekten das Überleben von Schwannzellen sichern können (Grinspan et al. 1996; Yu et al. 2005). Zwei wichtige Signalwege konnten mit der Induktion der Apoptose von unreifen Schwannzellen in Verbindung gebracht werden: der *Nerve growth factor* (NGF), über seinen Rezeptor p75^{NTR} (Soilu-Hanninen et al. 1999; Syroid et al. 2000) und TGF- β (D'Antonio et al. 2006; Parkinson et al. 2001).

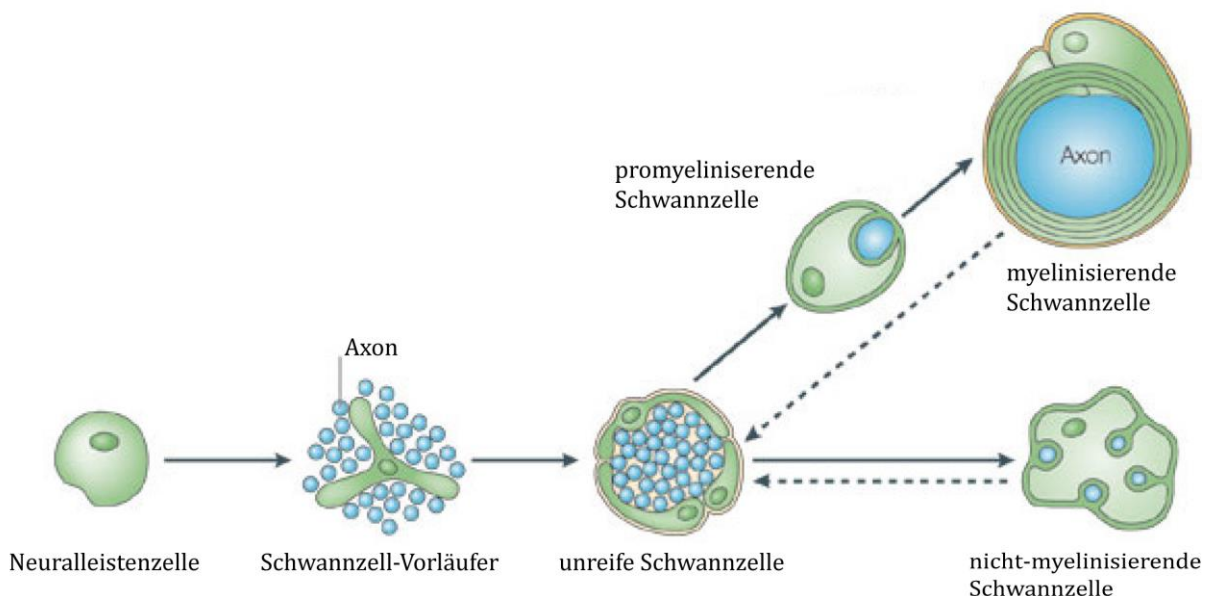


Abbildung 1: Die Entwicklungsstadien der Schwannzelle

Schwannzellen entwickeln sich über verschiedene Zwischenstufen aus den Zellen der Neuralleiste. Zunächst werden Schwannzell-Vorläufer ab dem 12. und 13. Tag der Embryonalentwicklung der Maus (E12/13) gebildet. Die Vorläuferzellen stabilisieren das Gewebe des embryonalen Nerven. Ab E15/16 gehen Schwannzell-Vorläufer in unreife Schwannzellen über. Diese umfassen Bündel von Axonen und bilden sogenannte Axon-Schwannzell-Familien.

Einzelne Axone mit einem Durchmesser $> 1 \mu\text{m}$ werden von unreifen Schwannzellen aus den Bündeln aussortiert (sog. *radial sorting*), um zur Myelinisierung vorbereitet zu werden. Es bildet sich ein 1:1-Verhältnis zwischen Schwannzelle und Axon. Die promyelinisierende Schwannzelle steht also jeweils nur zu einem Axon in Kontakt.

Bis zu 50 Axone mit einem Durchmesser $< 1 \mu\text{m}$ werden von nicht-myelinisierenden Schwannzellen umschlossen, die phänotypisch und auf Ebene der Proteinexpression den unreifen Schwannzellen ähneln. Die nicht-myelinisierende Schwannzelle bildet mit diesen ein sogenanntes Remak-Bündel.

Modifiziert nach: Jessen und Mirsky (2005), Seite 673.

1.1.1.3 Nicht-myelinisierende Schwannzellen

Axone mit einem Durchmesser kleiner als 1 μm , bei denen es sich typischerweise um sensorische C-Faser-Axone handelt, werden von sogenannten nicht-myelinisierenden Schwannzellen umschlossen. Eine nicht-myelinisierende Schwannzelle umfasst dafür bis zu 50 kleine Axone und bildet ein sogenanntes Remak-Bündel. Der molekulare und morphologische Phänotyp dieser möglichen Endstufe der Schwannzell-Entwicklung ist dem der unreifen Schwannzelle relativ ähnlich (Jessen und Mirsky 2005) (Abbildung 1). Einen Unterschied zu den SCP stellt beispielsweise die Expression der Galactosylceramidase sowie die der $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_7\beta_1$ -Integrine in nicht-myelinisierenden Schwannzellen dar (Previtali et al. 2003; Stewart et al. 1997).

1.1.1.4 Myelinisierende Schwannzellen

Axone mit einem Durchmesser von mehr als 1 μm werden von unreifen Schwannzellen separiert und aus den Axon-Schwannzell-Familien aussortiert, um später myelinisiert zu werden. Dieser Prozess wird als *radial sorting* bezeichnet (Martin und Webster 1973). Diese Schwannzellen, die auch als promyelinisierende Schwannzellen bezeichnet werden, assoziieren sich mit dem aussortierten Axon und geben den Kontakt zu den anderen Axonen des Bündels auf. Die Ausbildung eines 1:1-Verhältnisses von promyelinisierender Schwannzelle zu einem Axon wird als notwendiger Entwicklungsschritt zur späteren Myelinisierung verstanden.

Der Übergang der promyelinisierenden Schwannzelle in die myelinisierende Schwannzelle beginnt mit der Geburt und ist nach der ersten postnatalen Woche bei den meisten Zellen abgeschlossen (Abbildung 1). Die myelinisierende Schwannzelle hat im Vergleich zu ihrem Vorläufer grundlegende Änderungen ihres Expressionsmusters vollzogen. Ein Netzwerk aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert den zentralen Transkriptionsfaktor Krox20/Egr2, dessen Aktivität den Übergang aus dem Stadium der promyelinisierenden in die myelinisierende Schwannzelle markiert (Britsch et al. 2001; Ghislain und Charnay 2006; Jaegle et al. 2003). Krox20/Egr2 seinerseits induziert die verstärkte Transkription verschiedener Proteine der Myelinscheide, wie *Myelin protein zero* (P0), *myelin basic protein* (MBP), *myelin-associated glycoprotein* (MAG), *peripheral Myelin protein-22* (PMP22) und *connexin-32* (Cx32) (Le et al. 2005; Nagarajan et al. 2001; Topilko et al. 1994). Darüberhinaus ist Krox20/Egr2 an der Regulation verschiedener Gene der Lipidbiosynthese beteiligt (Leblanc et al. 2005). Die myelinisierende Schwannzelle beginnt somit durch die Produktion spezifischer Membranlipide und Proteine mit der Ausbildung der Myelinscheide um das assoziierte periphere Axon.

1.1.2 Bildung von Myelin

Die myelinisierende Schwannzelle umwickelt ihr zugehöriges Axon mit multiplen Schichten ihrer Zellmembran. Während der Myelinisierung vergrößert die Schwannzelle ihre Oberfläche um mehr als das Tausendfache in wenigen Tagen. Dieser Prozess erfordert eine Expression myelin-spezifischer Gene (siehe 1.1.1.4) sowie die Produktion einer großen Menge an Membranlipiden, die die Myelinscheide als ein hochspezialisiertes Kompartiment der Schwannzelle formen (Verheijen et al. 2003).

Auf elektronenmikroskopischen Bildern zeigt die entwickelte Myelinscheide eine charakteristische Ultrastruktur von kompaktierten Membranschichten. Die extrazellulären

Seiten der jeweiligen Membranwicklung bilden mit der jeweils benachbarten Wicklung eine Doppelstruktur, die als *intraperiod line* bezeichnet wird. Die eng aneinander anliegenden intrazellulären Seiten einer Membranwicklung bilden die sogenannte *major dense line*.

Die Dicke der Myelinscheide, bestimmt durch die Anzahl an Membranwicklungen um das Axon, steht in einem annähernd konstanten Verhältnis zum Durchmesser des Axons. Je größer das Axon, desto dicker seine Myelinscheide. Dieses Verhältnis kann über den Quotienten 'Durchmesser des Axons geteilt durch den Durchmesser der myelinisierten Faser', die sogenannte *g-ratio* quantifiziert werden (Friede und Bischhausen 1982; Pannese et al. 1987).

Zellkultur-Experimente mit Co-Kulturen von Schwannzellen und Neuronen sowie experimentelle Nerv-Transplantationen konnten zeigen, dass das jeweilige Axon selbst signalisiert, ob es myelinisiert wird oder nicht (Aguayo et al. 1976; Simpson und Young 1945; Weinberg und Spencer 1975). Die verschiedenen Signalsysteme, die an der Prozessierung der Signale zur Myelinisierung beteiligt sind, werden im Folgenden dargestellt.

1.1.3 Signalwege bei der Myelinisierung

1.1.3.1 Neuregulin1 und der ErbB2/3-Rezeptor

Ein zentrales Signal zur Initiation und Regulation der Myelinisierung zwischen Axon und Schwannzelle stellt Neuregulin1 (NRG1) dar. Die Neureguline sind eine Familie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Vier Neuregulin-Gene sind bisher identifiziert (*Nrg1-4*), von denen *Nrg1* das am besten untersuchte repräsentiert (Buonanno und Fischbach 2001; Falls 2003). *Nrg1* gehört zu den größten Genen der Säugetiere. Durch verschiedene Promotoren und alternatives Splicing des Primärtranskripts kann eine Vielzahl an Protein-Isoformen von NRG1 entstehen. Sämtliche bekannte Isoformen haben eine *epidermal growth factor like* (EGF-like)-Proteindomäne als Rezeptorbindungsstelle gemeinsam. Es bestehen jedoch Unterschiede im Molekulargewicht und der Membranbindungsfähigkeit zwischen den verschiedenen Isoformen.

Als Rezeptoren für NRG1 wurden die ErbB-Tyrosinkinase-Rezeptoren identifiziert (Holmes et al. 1992; Wen et al. 1992). Für Schwannzellen konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor für NRG1 ein Heterodimer aus einem ErbB2- und ErbB3-Protein darstellt (Garratt et al. 2000a). Durch die hochaffine Bindung von NRG1 an die ErbB3-Komponente bildet diese ein Dimer mit der katalytisch-aktiven ErbB2-Komponente, die den Rezeptor durch Autophosphorylierung aktiviert. Der aktivierte ErbB2/3-Rezeptor leitet das NRG1-Signal über verschiedene Signalkaskaden intrazellulär weiter (Citri et al. 2003).

Durch die Variabilität seiner Expression wurden die verschiedenen Isoformen von NRG1 mehrfach entdeckt und verschieden benannt. In Zellkulturexperimenten wurde beispielsweise das lösliche NRG1 Typ II als ein Mitogen für Schwannzellen identifiziert und als *glial growth factor* (GGF) bezeichnet (Brookes et al. 1980). Später zeigte sich, dass NRG1 Typ III als membrangebundene Isoform besonders von Motoneuronen und sensorischen Neuronen exprimiert wird. Es wurde daher als *sensory and motor neuron derived factor* (SMDF) bezeichnet (Ho et al. 1995). Die Analyse von verschiedenen Isoform-spezifischen Mausmutanten ergab, dass intaktes NRG1 Typ III allein ausreicht, um den aus Mausmutanten mit einem defekten *Nrg1*-Gen bekannten Entwicklungsdefekt der Schwannzellen zu verhindern (Meyer und Birchmeier 1995; Meyer et al. 1997). In Zebrafisch-Mutanten konnte zudem die Funktion der NRG1-ErbB2/3-Signalkaskade für die Regulation der zielgerichteten Migration von SCP entlang embryonaler Nerven visualisiert werden (Lyons et al. 2005). Somit scheint NRG1 Typ III die entscheidende

Isoform zur Regulation des Überlebens, der Proliferation und der Migration von Schwannzellen zu sein.

In der Myelinisierung von peripheren Axonen durch Schwannzellen konnten für NRG1 Typ III im Zusammenspiel mit dem ErbB2/3 Rezeptor ebenfalls wichtige Funktionen aufgedeckt werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass in Co-Kulturen mit Schwannzellen und Neuronen von Mausmutanten, die auf Grund einer homozygoten Isoform-spezifischen Null-Mutation von *Nrg1* kein NRG1 Typ III exprimieren, die Axone weder aussortiert noch myelinisiert wurden. Heterozygote NRG1 Typ III-Null-Mutanten zeigten ein vermindertes *radial sorting* mit übergroßen, nicht-separierten Bündeln unmyelinisierter Axone. Wurde in sympathischen Neuronen die Expressionsstärke von NRG1 Typ III über einen viralen Vektor stark gesteigert, konnte sogar eine ektope Myelinisierung dieser normalerweise nicht-myelinisierten Axone *in vitro* induziert werden (Taveggia et al. 2005).

Es wird daher vermutet, dass die Signalstärke von NRG1 Typ III auf axonalen Membranen nach Überschreitung eines gewissen Schwellenwerts das *radial sorting* und deren konsekutive Myelinisierung durch Schwannzellen initiiert. Das Nichterreichen dieses Schwellenwertes bei Axonen mit einem Durchmesser kleiner 1 μm führt in diesem Modell zur Bildung von „Remak-Bündeln“ durch nicht-myelinisierende Schwannzellen (Nave und Salzer 2006) (Abbildung 2).

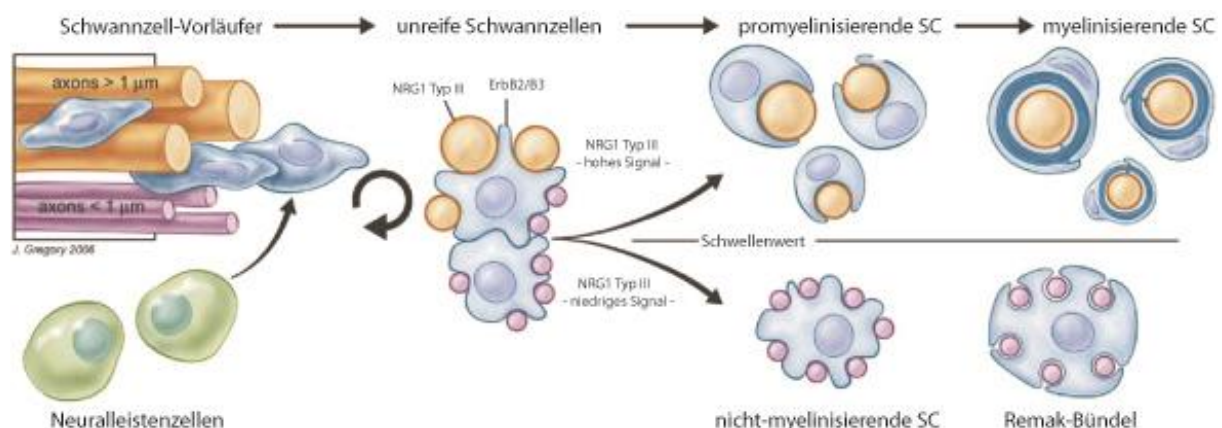


Abbildung 2: Regulation der Schwannzell-Entwicklung durch Neuregulin1 Typ III

In der Embryonalentwicklung haben die aus den Neuralleistenzellen stammenden Schwannzell-Vorläufer (SCP) engen Kontakt zu den auswachsenden embryonalen Axonen. Axonal-gebundenes Neuregulin1 Typ III (NRG1 Typ III) aktiviert ErbB2/3 abhängige Signalkaskaden in der Schwannzelle zur Förderung von Proliferation und Differenzierung der SCP zu unreifen Schwannzellen (SC). Die Höhe des axonalen NRG1-Signals, das von unreifen SC über ErbB2/3-Rezeptoren detektiert wird, entscheidet darüber, ob sich die Schwannzelle zu einer promyelinisierenden SC oder zu einer nicht-myelinisierenden SC entwickelt. Promyelinisierende SC separieren ein Axon und bilden um dieses Myelin. Diese Axone haben in der Regel einen Durchmesser von > 1 μm . Nicht-myelinisierende SC bilden mit bis zu 50 unmyelinisierten Axonen sogenannte Remak-Bündel. Modifiziert nach: Nave und Salzer (2006), Seite 494.

In vivo konnte die Relevanz des *Nrg1* Signals bezüglich der Myelinisierung ebenfalls gezeigt werden: Mausmutanten, die eine heterozygote Null-Mutation für NRG1 Typ III tragen und nur eine 50%ige Gendosis exprimieren, zeigten histologisch eine verminderte Myelindicke (Hypomyelinisierung) (Michailov et al. 2004). Eine ähnliche Hypomyelinisierung entwickelten auch Mausmutanten mit einer ab dem Zeitpunkt der Myelinisierung induzierten Null-Mutation

von ErbB2 (Garratt et al. 2000b). Die Menge an NRG1 Typ III scheint dabei der limitierende Faktor zu sein, da heterozygote ErbB2- oder ErbB3-Mutanten, im Gegensatz zu den heterozygoten NRG1-Mutanten, keine Auffälligkeiten der Myelinscheide zeigten. Zudem entwickelten Mäuse mit einer frühen postnatalen Überexpression von transgenem NRG1 Typ III eine gesteigerte Myelindicke (Hypermyelinisierung) (Michailov et al. 2004). Daraus lässt sich schließen, dass die Menge an axonal-präsentiertem NRG1 Typ III der Schwannzelle signalisiert, wie viele Membranwicklungen sie ausbilden wird und somit die Dicke der Myelinscheide bestimmt. (Nave und Salzer 2006) (Abbildung 3).

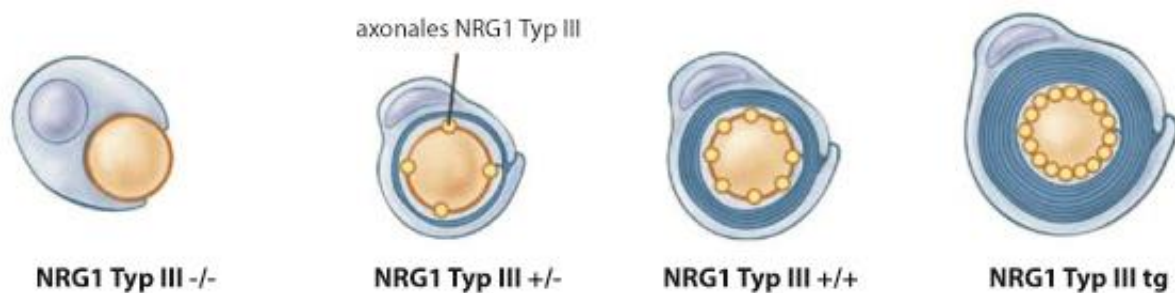


Abbildung 3: Regulation der Myelindicke durch axonales Neuregulin1 Typ III

Bei der Regulation der Myelindicke zeigt sich die Anzahl der Membranwicklungen um das Axon als direkte Funktion der Menge von axonalem Neuregulin1 Typ III (NRG1III) (Gelbe Punkte). Histologisch zeigen homozygote NRG1III-Null-mutante Mäuse (NRG1 Typ III $-/-$) kein Myelin und sterben kurz nach der Geburt. Mäuse, die heterozygote Träger des NRG1-Null-Allels sind (NRG1 Typ III $+/-$), zeigen auf Grund der geringeren axonalen Konzentration von NRG1III phänotypisch im Vergleich zu Wildtyptieren (NRG1 Typ III $+/+$) eine Hypomyelinisierung. Transgene Mausmutanten, die NRG1III unter einem neuronal aktiven Promotor überexprimieren, weisen analog eine Hypermyelinisierung auf.

Modifiziert nach: Nave und Salzer (2006), Seite 494.

Auch für nicht-myelinisierende Schwannzellen scheint das NRG1-ErbB-Signal wichtige Funktionen zu erfüllen. Die selektive Überexpression eines dominant-negativen ErbB4-Rezeptors in nicht-myelinisierenden Schwannzellen führte in Mausmutanten zu einem neuropathischen Phänotyp mit Verlust von kleinen C-Faser-Axonen und Spinalganglien. Die Versuchstiere zeigten klinisch eine verminderte Schmerzempfindlichkeit (Chen et al. 2003).

NRG1 Typ III stellt somit ein zentrales Signal in der Schwannzellbiologie dar, das zusätzlich zur Förderung von Proliferation, Wachstum, Migration und Reifung in der Embryonalentwicklung auch die Bildung von Myelin initiiert und reguliert (Birchmeier und Nave 2008).

1.1.3.2 Der PI3K-AKT Signalweg

Die „Phosphoinositid-3-Kinasen“ (PI3K) sind eine Proteinfamilie, die im Allgemeinen an der Regulation von Zellgröße, Metabolismus, Proliferation, Glukose-Homöostase und am intrazellulären Vesikeltransfer beteiligt sind (Engelman et al. 2006). Sie wurden auf Grund ihrer verschiedenen Substrate in 3 Klassen eingeteilt (Cantley 2002): Klasse I wird weiter unterteilt in Klasse IA (PI3KIA), die von „Rezeptor-Tyrosin-Kinasen“ (RTKs) aktiviert wird und Klasse IB (PI3KIB), die von „G-Protein-gekoppelten Rezeptoren“ (GPCRs) aktiviert wird. PI3KIA und PI3KIB phosphorylieren nach Aktivierung membrangebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) (Katso et al. 2001). Die

Klasse II produziert Phosphatidyl-3,4-bisphosphat und kann ebenfalls durch RTKs, Integrine und Zytokinrezeptoren aktiviert werden (Engelman et al. 2006). Die Klasse III ist ebenfalls in den intrazellulären Vesikeltransport involviert und interagiert mit PI3KI, ist aber noch wenig erforscht (Backer 2008; Carracedo und Pandolfi 2008).

Im Folgenden wird mit PI3K ausschließlich auf die Klasse IA verwiesen, da sie diejenige ist, die nachweislich durch RTKs, wie ErbB2/3 (siehe 1.1.3.1), aktiviert wird und über die Generierung des membrangebundenen *second messenger* PIP3 die Proteinkinase AKT aktiviert. Die PI3K besteht aus 2 Untereinheiten: die regulatorische Untereinheit p85 verbindet die katalytische Untereinheit p110 mit dem aktivierten RTK-Rezeptor, so dass p110 membrangebundenes PIP2 zu PIP3 phosphorylieren kann. Der mit PIP3 angereicherte Bereich der Plasmamembran zieht verschiedene Effektorproteine an, die durch ihre *Pleckstrin homology*- (PH) und PH-ähnlichen (PH-like) Domänen eine hochaffine Bindung mit PIP3 eingehen (Cantley 2002).

Durch die zweidimensionale Verteilung von PIP3 in der Plasmamembran ist das PI3K-Signal vermutlich an der Polarisierung von Epithelzellen und der zielgerichteten Migration von neutrophilen Granulozyten durch chemotaktische Stimuli beteiligt (Leslie et al. 2008; Van Haastert und Devreotes 2004). PIP3 rekrutiert verschiedene Effektorproteine an die Plasmamembran, wie *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) und „GTPase aktivierende Proteine“ (GAPs). GEFs und GAPs steuern die Aktivität von Rho-GTPasen, wie Rac1 und CDC42, sowie den Rac-Effektorproteinen (WAVE und WASP). Diese Rho-GTPasen regulieren über die lokale Polymerisation von Aktinfilamenten, Prozesse wie Membranwachstum, Motilität und Zellpolarität (Charest und Firtel 2007; Di Paolo und De Camilli 2006).

Einer der am besten charakterisierten Effektoren der PI3K ist die Proteinkinase B (PKB), auch als AKT bezeichnet. Durch seine PH-Domäne kolokalisiert AKT mit der *PIP3-dependent protein kinase-1* (PDK1) (Alessi et al. 1997) und dem *mammalian target of rapamycin-complex 2* (mTORC2) an der mit PIP3 angereicherten Plasmamembran (Sarbasov et al. 2005). Dort wird AKT von diesen Interaktionspartnern durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ aktiviert. Phosphoryliertes AKT (p-AKT) hat über 100 Substrate und moduliert somit vielfältige zelluläre Funktionen, zu denen Größenwachstum, Überleben, Metabolismus und Glukose-Homöostase gehören (Carracedo und Pandolfi 2008) (Abbildung 4). AKT ist ein wichtiger positiver Regulator des Multiprotein-Komplexes *mammalian target of rapamycin-complex 1* (mTORC1), der den translationalen Apparat der Zelle steuert. Das ribosomale S6-Protein wird dabei indirekt über die Phosphorylierung der S6-Kinase durch mTORC1 aktiviert (Guertin und Sabatini 2007).

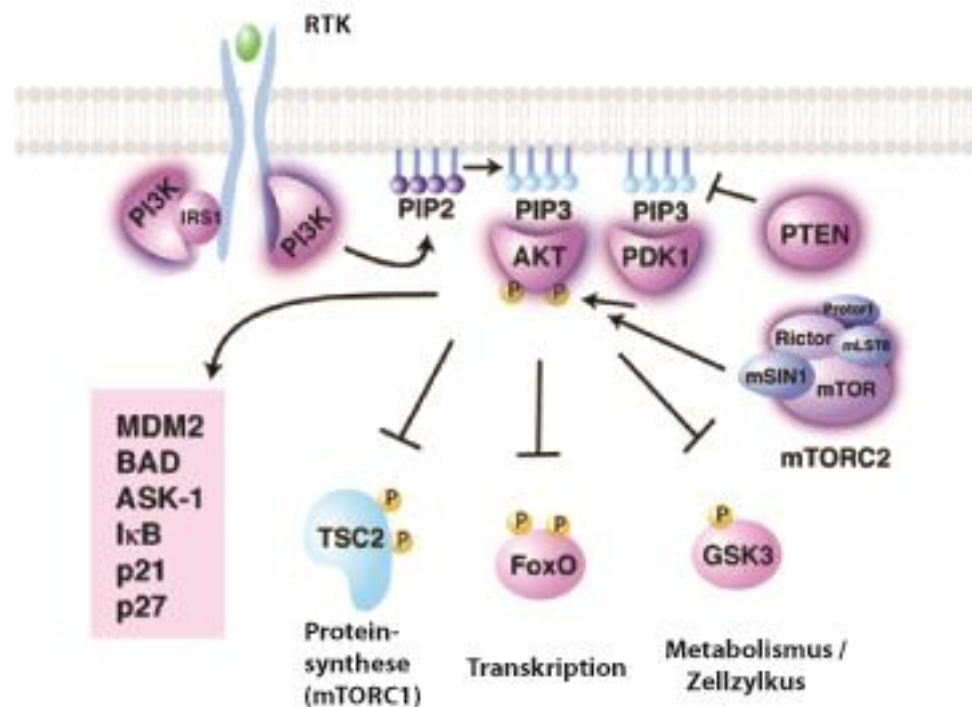


Abbildung 4: Der PI3K-AKT -Signalweg

Nach Ligandenbindung (grüner Punkt) der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) wird die Phosphoinositid-3-Kinase Klasse IA (PI3K) aktiviert. Die aktivierte PI3K generiert aus Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat (PIP₂) den *second messenger* Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃). Die Phosphatase *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten* (PTEN) agiert als Regulator des PIP₃-Signals, indem sie PIP₃ zu PIP₂ abbaut. Die Proteinkinase AKT wird durch ihre PIP₃-affinen Bindungsstellen – zusammen mit PIP₃-dependent protein kinase-1 (PDK1) – zur Plasmamembran transloziert. PDK1 und der Co-Faktor *Mammalian target of rapamycin-complex 2* (mTORC2) aktivieren AKT durch zweifache Phosphorylierung. Die aktivierte Proteinkinase AKT reguliert durch Aktivierung oder Inhibition vielfältige Effektorproteine zur Regulation zellulärer Prozesse.

Modifiziert nach: Guertin und Sabatini (2007), Seite 10.

1.1.3.3 Zusammenspiel von PI3K-AKT und MAPK

In der Schwannzellbiologie wurde die NRG1-PI3K-AKT-mTOR-Signalachse und der *Mitogen activated protein kinase*- (MAPK)-Signalweg als bedeutend für die Schwannzellentwicklung und Myelinisierung identifiziert (Nave und Salzer 2006). In verschiedenen Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass GGF – eine lösliche NRG1-Isoform (siehe 1.1.3.1) – den MAPK- und den PI3K-Signalweg in Schwannzellen aktiviert (Maurel und Salzer 2000; Ogata et al. 2004).

In vitro aktivierte NRG1 Typ III in Schwannzellen den PI3K-Signalweg, jedoch nicht den MAPK-Signalweg (Taveggia et al. 2005). Die Expression dominant-negativer Formen von PI3K und AKT inhibierte die Myelinbildung *in vitro* (Ogata et al. 2004). Dazu passend führte eine konditionale Inaktivierung des PI3K-AKT-Effektors mTOR in Schwannzellen zu deutlichen Myelinisierungsdefekten im Mausmodell (Sherman et al. 2012).

Eine Überexpression von PI3K und konstitutiv-aktivem AKT steigerte hingegen sowohl die Expression von Myelinproteinen *in vitro* als auch die Bildung von Myelin in Regenerationsexperimenten *in vivo* (Ogata et al. 2004). Jedoch bewirkte die Expression von

konstitutiv-aktivem AKT *in vivo* keine Veränderung der Myelinisierung im PNS (Flores et al. 2008).

Bezüglich des MAPK-Signalwegs führte seine gesteigerte Aktivierung *in vitro* zur Inhibition der Myelinbildung (Ogata et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnte aber im Mausmodell gezeigt werden, dass die Expression einer konstitutiv-aktiven MAPK1 in ErbB3-defizienten Mausmutanten, in denen die NRG1-PI3K-AKT-Signalachse gestört ist, deren gestörte Myelinbildung teilweise ausgleichen konnte (Sheean et al. 2014).

Diese mitunter widersprüchlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine komplexe Balance des Netzwerks verschiedener intrazelluläre Signalwege für die Schwannzellendifferenzierung und für die physiologische Myelinisierung *in vivo* notwendig sind.

1.1.3.4 GDNF und NGF

Die Injektion des Neurotrophins *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) führte bei Ratten sowohl zu einer Proliferation von Schwannzellen als auch zu einer Myelinisierung von normalerweise unmyelinisierten C-Faser-Axonen in den Versuchstieren (Hoke et al. 2003). Diese Wirkung wurde als ein indirekter Effekt interpretiert, denn GDNF – wie auch der *nerve growth factor* (NGF) – werden von Schwannzellen produziert und sind potente Induktoren einer parakrinen Sekretion von NRG1 Typ I und II durch proteolytische Spaltung (Esper und Loeb 2004). Zusammen mit der Erkenntnis, dass NRG1 die Sekretion von GDNF durch Schwannzellen fördert (Chen et al. 2003) lässt sich eine regulatorische Feed-back-Schleife zwischen Axon und Schwannzelle über Wachstumsfaktoren wie NRG1, GDNF und NGF vermuten die eine Differenzierung von Schwannzellen mit neuronalem Überlebenssignalen verknüpft (Nave und Salzer 2006).

1.1.3.5 Laminin und cAMP-abhängige Signalwege

Die Formation einer Basalmembran ist eine notwendige Voraussetzung für Schwannzellen, um Axone einzuschließen und Myelin zu bilden (Bunge 1993). Laminine sind eine Hauptkomponente von Basalmembranen. Mutationen des Laminin- α 2-Gens verursachen nachweislich eine Form der Kongenitalen muskulären Dystrophie mit einer dysmyelinisierenden peripheren Neuropathie beim Menschen und im Tiermodell (Helbling-Leclerc et al. 1995; Xu et al. 1994). Die Schwannzell-spezifische Inaktivierung von β 1-Integrin – einem Bestandteil vieler Laminin-Rezeptoren – erzeugte im Mausmodell ebenfalls eine periphere Neuropathie mit gestörtem *radial sorting* (Feltri et al. 2002). Die genetische Ablation der kompletten Laminin-Expression in Mausmutanten führte zu einer Störung der Axon-Schwannzell-Interaktion. Die Schwannzellen verweilten in einem prämyelinisierenden Stadium mit verminderter Aktivität der PI3K, erhöhter Apoptoserate und ohne *radial sorting* (Yu et al. 2005).

1.2 Der Tumorsuppressor PTEN

Die Lipid- und Proteinphosphatase *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) wird durch das *Pten*-Gen auf Chromosom 10q23-24 des Menschen kodiert (Li et al. 1997). Das 55 kDa-Protein PTEN kann in katalytische und regulatorische Abschnitte sowie in Abschnitte, die eine

Lokalisierung von PTEN in der Zelle kontrollieren, eingeteilt werden. Das Exon 5 kodiert für die N-terminale Lipidphosphatase-Domäne des PTEN-Proteins, durch die PTEN als Gegenspieler des PI3K-Signalwegs wirkt. Die PI3K vermittelt ihr Signal über den membrangebundenen *second messenger* Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3), den sie durch Phosphorylierung aus dem ebenfalls membrangebundenen Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP2) produziert. PTEN dephosphoryliert im Normalfall überschüssiges PIP3 zurück zu PIP2 (Stambolic et al. 1998). Am C-terminalen Ende befindet sich eine *PSD95-DlgA-Zo-1* (PDZ)-Bindungsdomäne, die vermutlich die intrazelluläre Lokalisation von PTEN durch Bindung an Proteine mit passender Bindungssequenz bestimmt. Bemerkenswert ist, dass die Interaktion von PTEN mit *mammalian disks large homolog 1* (DLG1) – einem Protein mit einer passenden PDZ-Domäne – notwendig ist für eine physiologische Myelinbildung in Schwannzellen (Cotter et al. 2010). Weiterhin finden sich über sämtliche Abschnitte verteilt Regionen für posttranslationale Modifikationen (Abbildung 5).

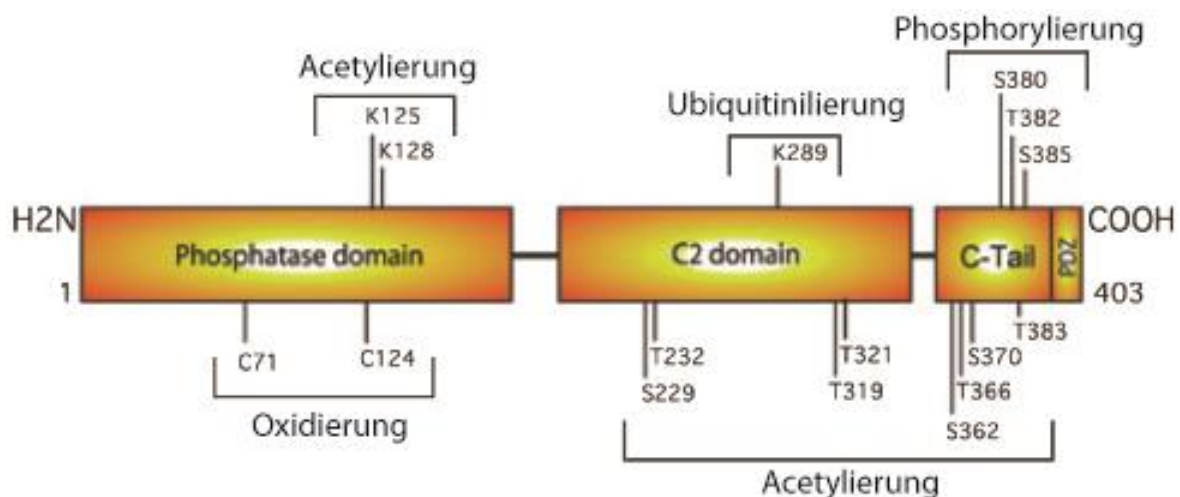


Abbildung 5: Die Struktur des PTEN-Proteins

Das 55 kDa-Enzym PTEN beinhaltet eine N-Terminale Phosphatase Domäne, eine Zentrale C2-Domäne und einen C-Terminalen Schwanz (C-Tail). Jeder Abschnitt besitzt Abschnitte für posttranslationale Modifikationen, wie angegeben. Die *C2-domain* und die *PSD95-DlgA-Zo-1*-Bindungssequenz (PDZ) sind Bindungsstellen für Proteine die vermutlich die intrazelluläre Lokalisation von PTEN bestimmen.

Modifiziert nach: Madhunapantula und Robertson (2009), Seite 401.

Pten ist das am zweithäufigsten mutierte Tumorsuppressorgen in sporadischen Malignomen des Menschen (Stokoe 2001). Eine Mutation oder der komplette Verlust von PTEN kann regelmäßig in Gewebebiopsien von primären Glioblastomen, Mamma-, Bronchial- und Nierenzellkarzinomen sowie Endometriumkarzinomen und dem malignen Melanom festgestellt werden (Birck et al. 2000; Harima et al. 2001; Kohno et al. 1998; Steck et al. 1997).

Im Mausmodell führt eine homozygote Null-Mutation von *Pten* zum Tod zwischen Tag 9 und 10 der Embryonalentwicklung (E9.5). Von Mäusen mit einer heterozygoten Null-Mutation versterben die Hälfte im Alter von 1 Jahr. Die Überlebenden entwickeln tumoröse Neoplasien verschiedener Gewebe sowie Anzeichen von Autoimmunpathologien (Suzuki et al. 2008).

Der „konditionale knock-out“ von *Pten* in verschiedenen Geweben führte bei den Versuchstieren regelmäßig zu Neoplasien, beispielsweise in der Brustdrüse, der Haut und der Prostata

(Backman et al. 2004; Li et al. 2002). Aus den verschiedenen konditionalen Knock-Out-Experimenten lässt sich schließen, dass der Verlust von PTEN im Allgemeinen zur einer verstärkten Proliferation, einer erhöhten Resistenz gegen Apoptosesignale und einem verstärkten Stammzellerhalt im Zielgewebe führt (Groszer et al. 2001; He et al. 2007; Kimura et al. 2003). Weiterhin wurde von einer Erhöhung der Zell- und Organgröße – beispielsweise bei Herzmuskelzellen und Neuronen des Cerebellums – berichtet (Backman et al. 2001; Crackower et al. 2002). Das Fehlen von PTEN im Nukleus scheint zu einer Instabilität der Zentromerregion sowie zu DNA-Doppelstrangbrüchen zu führen. All diese Effekte bewirken vermutlich eine höhere Anfälligkeit für Karzinogene und weitere epigenetische Veränderungen, die zur Entwicklung von Malignomen führen können (Suzuki et al. 2008).

1.2.1 PTEN als Regulator des PI3-Kinase-Signalwegs

PTEN agiert als Regulator des PI3K-Signalwegs, indem es als Lipidphosphatase den für das PI3K-Signal benötigten *second messenger* PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert (Maehama und Dixon 1998; Stambolic et al. 1998) (Abbildung 4). In Experimenten mit konditionaler Exzision von Exon 5 im Mausmodell büßt PTEN seine Lipidphosphatase-Funktion ein. In den vorbeschriebenen Mausmutanten konnte daher regelmäßig eine unphysiologische Anreicherung von PIP3 im jeweiligen Zielgewebe mitsamt einer verstärkten Aktivierung der PI3K-AKT-mTOR-Signalachse nachgewiesen werden (Liliental et al. 2000; Sun et al. 1999; Wu et al. 1998).

Weitere bekannte Lipidphosphatasen wie SHIP, SHIP2 und SKIP dephosphorylieren PIP3 an anderer Stelle zu Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat. Mausmutanten mit Verlust von SHIP und SHIP2 zeigten aber weder eine erhöhte Konzentration von PIP3 mit gesteigerter AKT-Aktivität noch entwickelten sie Malignome (Fukui et al. 2005; Liu et al. 1999).

1.2.2 PTEN in der Polarisierung und Migration von Zellen

In Studien mit der Amöbe *Dictyostelium discoideum* konnte gezeigt werden, dass PTEN ein wichtiger Faktor während der gezielten chemotaktischen Migration ist. PTEN akkumuliert dabei lateral und an der Hinterseite der migrierenden Zelle, während die vom jeweiligen Botenstoff aktivierte PI3K an der Vorderseite PIP3 produziert. Die Anreicherung von PIP3 wird durch PTEN auf die Vorderseite, in Richtung der Migration, beschränkt (Van Haastert und Devreotes 2004). Bei Verlust von PTEN findet sich PIP3 gleichmäßig verteilt und die gezielte Migration der Einzeller ist gestört (Funamoto et al. 2002).

Bei neutrophilen Granulozyten zeigte sich ebenfalls, dass während der Chemotaxis PTEN zur Rückseite lokalisiert wird. Dieser Prozess ist abhängig von den kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und RhoA. Die *RhoA-associated kinase* (Rock) bildet einen Komplex mit RhoA und PTEN an der Rückseite der migrierenden Zelle und aktiviert die Lipidphosphatase-Aktivität von PTEN. Die Lokalisierung von RhoA zur Rückseite ist zudem abhängig von aktiviertem Cdc42 (Li et al. 2005). Beide Signalwege kontrollieren zusammen die Polymerisierung von F-Aktin durch die GTPase Rac und somit das Auswachsen von Lamellipodien bei der Migration (Meili et al. 2005). PTEN ist somit nicht nur ein Regulator der PI3K-Signalstärke, sondern auch der Signallokalisation an der Zellmembran. Es ist vermutlich in verschiedenen Zelltypen an der Regulation von Prozessen wie der Zellpolarisierung und dem Auswachsen von Lamellipodien während der Migration beteiligt (Leslie et al. 2008).

1.2.3 PTEN-assoziierte Erbkrankheiten

Keimbahnmutationen von PTEN verursachen erbliche Erkrankungen des Menschen, wie die *Cowden disease* (CD), das *Bannayan–Riley–Ruvalcaba syndrome* und die *Lhermitte-Duclos disease* (LDD). Sämtliche Erkrankungen sind durch eine Bildung von multiplen Hamartomen und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von sekundären Malignomen gekennzeichnet. Die CD ist zusätzlich durch Malignome der Brustdrüse und Schilddrüse charakterisiert. Die LDD zeigt eine Makrozephalie mit Ataxie und eine zerebelläre Gangliomatose (Liaw et al. 1997; Marsh et al. 1997).

1.3 Hereditäre Neuropathien des peripheren Nervensystems

Erstmals wurde von Charcot und Marie eine hereditäre, distal betonte, langsam progrediente, symmetrische Muskelatrophie der Füße und Beine als Krankheitsentität beschrieben (Charcot und Marie 1886). Unabhängig und zeitgleich beschrieb Tooth eine progressive Muskelatrophie mit identischer Symptomatik (Tooth 1886). Die Bezeichnung *Charcot-Marie-Tooth disease* (CMT) ist bis heute in Gebrauch. Die CMT wird nach klinischen und genetischen Merkmalen weiter in 6 Gruppen unterteilt: CMT1 bis CMT4, die „dominant intermediäre CMT“ (CMTDI), die „X-chromosomal-dominante CMT“ (CMTX) sowie einige Sonderformen (Dyck 1968).

Die CMT ist eine der häufigsten Erbkrankheiten des Menschen. Dabei stellen die Untergruppen der CMT1 mit circa 80% und der CMT2 mit circa 20% aller CMT-Patienten die häufigsten Formen dar (Martyn und Hughes 1997). Die CMT1 umfasst die demyelinisierenden Formen, die klinisch eine verminderte Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) von 10–40 m/s in den Armen zeigen. Histologisch ist die CMT1 durch axonalen Verlust mit segmentalen Demyelinisierungen und Remyelinisierungen gekennzeichnet. Formen der CMT2 zeigen klinisch einen späteren Beginn und nur eine geringe Verminderung der NLG bis 38 m/s. Histologisch findet sich ein axonaler Verlust aber sehr wenig De- und Remyelinisierungen. CMT1 und CMT2 beruhen mit Ausnahme der CMT2B1 auf autosomal-dominanten Mutationen. Das Paradigma, dass die Demyelinisierung der CMT1 ursächlich auf Gendefekten der Schwannzelle und der axonale Verlust der CMT2 auf Mutation neuronenspezifischer Gene beruhen sollte, musste verlassen werden. Eine Mutation des axonalen Neurofilament-Leichtkettengens (NEFL) ruft beispielsweise eine Demyelinisierung hervor und wurde demnach als CMT1E und als CMT2E klassifiziert (Fabrizi et al. 2007). Weiterhin wurde die Klasse der dominant intermediären CMTDI eingeführt, um weitere Zwischenformen von CMT1 und CMT2 zu erfassen.

CMT3, auch als *Déjérine-Sottas neuropathy* (DSN) bezeichnet, ist eine besonders schwere Form mit Beginn bis zum zweiten Lebensjahr und einer NLG ist unter 10 m/s. Es handelt sich um eine sogenannte dysmyelinisierende Neuropathie, da die defekten Schwannzellen in ihrer Entwicklung wahrscheinlich niemals in der Lage waren intaktes Myelin zu bilden.

Die Gruppe der CMT4 umfasst demyelinisierende Formen, die auf autosomal-rezessiven Gendefekten beruhen. Die verschiedenen Formen der CMT4 sind relativ selten.

Weiterhin wurden bisher 5 Formen einer x-chromosomal dominant-vererbten CMT beschrieben (CMTX1-5).

Als eine Sonderform gilt die autosomal-rezessiv vererbte *congenital hypomyelinating neuropathy* (CHN) eine der DSN ähnliche sehr schwere Form mit Beginn in der Kindheit, die laut aktueller Klassifikation auch als CMT4E bezeichnet wird.

Eine weitere Sonderform ist die autosomal-dominant vererbte *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies* (HNPP), eine eher milde Form mit fokalen Myelinschwellungen, sogenannten Tomacula. Patienten mit HNPP reagieren auf kleinste Neurotraumen mit sensomotorischen Ausfällen, die sich innerhalb von Wochen zurückbilden aber auch persistieren können (Behse et al. 1972).

Die zuvor beschriebenen Formen der CMT werden in den Klassen der *hereditary motor and sensory neuropathy* (HMSN) zusammengefasst. Die HMSN1 umfasst die CMT1 und CMT4 als demyelinisierende Formen. Die HMSN2 entspricht der CMT2, die HMSN3 der CMT3. Die weiteren Gruppen der HMSN4-7 sind sehr selten (Kuhlenbaumer et al. 2002).

Als weitere Klassen der hereditären Neuropathien wurden entsprechend der betroffenen Fasertypen die *hereditary sensory and autonomous neuropathy* (HSAN) und die *distal hereditary motor neuropathy* (dHMN) definiert (Harding 1993).

Eine aktuelle Übersicht über sämtliche bekannte hereditäre periphere Neuropathien mit ihren betroffenen Genen ist verfügbar unter [„www.molgen.ue.ac.be/CMTMutations“](http://www.molgen.ue.ac.be/CMTMutations).

1.3.1 Hereditäre Neuropathien mit fokalem Myelinwachstum

Unter den in 1.3 beschriebenen Neuropathien soll hier auf die Formen eingegangen werden, die sich histologisch durch ein fokal gesteigertes, morphologisch abweichendes Myelinwachstum in Form von fokalen Myelinschwellungen (Tomacula) oder Myelinausfaltungen (Myelin outfoldings) auszeichnen.

Als tomaculöse Neuropathie wird üblicherweise die HNPP bezeichnet, deren typisches Merkmal fokale Myelinschwellungen sind, die sich in „*teased fiber*-Präparationen“ wie eine Wurstkette darstellen (lateinisch: Tomaculum = Wurst) (Madrid und Bradley 1975). Der zugrundeliegende Gendefekt beruht beim Menschen auf einer Deletion von Chromosom 17p11.2-12, die das Gen für das *peripheral Myelin protein 22* (PMP22) einschließt (Chance et al. 1993). Eine Genduplikation von *Pmp22*, die zu einer Überexpression von PMP22 führt, verursacht hingegen die CMT1A (Lupski et al. 1991).

Weiterhin konnten Defekte des Gens für *Myelin protein zero* (P0) beim Menschen mit der Bildung von Tomacula assoziiert werden (Quattrone et al. 1996). Patienten, die an monoklonaler Gammopathie mit IgM-Antikörpern gegen *Myelin-associated glycoprotein* (MAG) erkrankten, entwickelten ebenfalls eine tomaculöse Neuropathie (Rebai et al. 1989). Entsprechende Mausmodelle mit Mutationen für PMP22, P0 und MAG, die ebenfalls eine tomaculöse Neuropathie entwickelten, konnten generiert werden (Adlkofer et al. 1995; Cai et al. 2002; Runker et al. 2004). Eine Gemeinsamkeit aller drei Proteine ist das HNK-1 Epitop, welches mit Zelladhäsionsprozessen in Verbindung gebracht wird (Sander et al. 2000).

Als demyelinisierende Neuropathien mit *Myelin outfoldings* wurden die CMT4B1 und CMT4B2 beschrieben. Die Myelinauswüchse treten an Stellen unkompakten Myelins auf, die als Paranodien und Schmidt-Lantermann-Inzisuren bezeichnet werden. Die zugrunde liegende Genmutationen betreffen das *Myotubularin related protein 2* und *13* (MTMR2 und MTMR13) (Azzedine et al. 2003; Bolino et al. 2004). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der

Verlust von MTMR2 in Schwannzellen ausreichte, um eine CMT4B1-ähnliche Neuropathie hervorzurufen (Bolis et al. 2005).

MTMR2 und MTMR13 sind als Phosphoinositid-Phosphatasen an dem sogenannten *membrane trafficking* beteiligt. Sie dephosphorylieren Phosphatidyl-3-phosphat (PI3P) und Phosphatidyl-(3,5)-phosphat (PI(3,5)P2) an der 3'-Stelle des Inositolzuckers. PI3P und PI(3,5)P2 wirken als Signalmoleküle für Membranaddition und -abbau, indem sie den Transport von Endosomen von und zur Plasmamembran regulieren (Di Paolo und De Camilli 2006). MTMR2 scheint ein negativer Regulator von Membranaddition in Schwannzellen zu sein, indem es sowohl mit Strukturproteinen der Plasmamembran wie DLG1 als auch mit Proteinen des Vesikeltransports wie Sec8 und Kif13B interagiert (Bolis et al. 2009).

Der intrazelluläre Membrantransports spielt vermutlich eine Rolle bei vielen Formen der CMT, da neben CMT4B1 und CMT4B2 – die betroffenen Gene bei der CMT4J – CMT4H und CMTDIB ebenfalls Phosphoinositid-phosphatasen sind oder Bindungsmotive für Phosphatidylinositole besitzen (Suter 2007). Weiterhin wurden auch für die Krankheitsmechanismen der häufigeren CMT-Formen wie der PMP22-assoziierten CMT1A eine Störung des intrazellulären Membrantransports vermutet (Berger et al. 2006).

1.4 Zielsetzung und Hypothese

Im peripheren Nervensystem (PNS) stellt axonal-präsentiertes Neuregulin1 Typ III (NRG1III) ein zentrales Signal für die Entwicklung von Schwannzellen, die Bildung von Myelin sowie die Interaktion zwischen Schwannzelle und Axon dar. Als Teil der intrazellulären Signalweiterleitung, die durch Bindung von NRG1III an seinen Rezeptor ErbB2/3 in Schwannzellen aktiviert wird, wurden unter anderem die ubiquitär vorhandene *Phosphoinositide-3-Kinase* (PI3K) und ihre Effektorproteinkinase AKT identifiziert.

Der von der PI3K produzierte membrangebundene *second messenger* Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) spielt, neben der Aktivierung von AKT, eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Lamellipodien, der Polarisierung und der Zellmigration. Die Phosphatase *Phosphatase and tensin homologue on chromosome ten* (PTEN) dephosphoryliert PIP3 zu Phosphatidyl-(4,5)-bisphosphat (PIP2), wodurch sie sowohl die Signalstärke als auch die Lokalisation des PI3K-Signals auf der Plasmamembran reguliert.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass der PI3K-AKT-Signalweg *in vivo* eine wichtige Rolle in der Initialisierung der Myelinisierung und der Regulation der Myelindicke, innerhalb der Schwannzelle spielt.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung einer Mauslinie, in der das *Pten*-Gen – unter Verwendung des Cre-LoxP Systems – konditional in Schwannzellen inaktiviert worden ist (*Pten*-Mutanten). Der Verlust von PTEN sollte zur Anreicherung von PIP3 und einer verstärkten Aktivität der gesamten PI3K-Signalkaskade in den Schwannzellen der *Pten*-Mutanten führen.

Durch den Vergleich der *Pten*-Mutanten mit bereits beschriebenen Mausmodellen, die beispielsweise eine veränderte Expression von NRG1 Typ III oder Faktoren des PI3K-AKT-Signalwegs aufweisen, wäre es möglich diese Hypothese zu testen und möglicherweise Rückschlüsse auf weitere Funktionen einer NRG1-PI3K-AKT-Signalachse in Schwannzellen zu ziehen.

Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) ist die häufigste hereditäre Neuropathie des Menschen. Eine gestörte Regulation des gerichteten Membrantransports unter Beteiligung membrangebundener Phosphoinositide wie PIP3 wurde in der Pathogenese verschiedener Unterformen der CMT bereits vermutet. Durch Vergleich der *Pten*-Mutanten mit den vorbeschriebenen Mausmodellen verschiedener CMT-Formen ließe sich somit mehr über die Rolle der Phosphoinositide in der Entstehung der verschiedenen CMT-Formen in Erfahrung bringen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Chemikalien und Bioreagenzien*

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 30% in H ₂ O (PAA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agarose	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Merck, Darmstadt
Avertin:	
1g Triobrommethanol (Aldrich)	
0,81 ml Amylalkohol (Merck)	
71,49 ml H ₂ O	
Azur-II-Farbstoff	Merck, Darmstadt
Bleicitrat:	
1,33g Bleinitrat (Merck)	
1,76g Natriumcitrat (Merck)	
30 ml H ₂ O	
Bromphenolblau	International Biotechnologie Inc.
Chloroform	Merck, Darmstadt
DDSA (2-Duodecenyloxy-succinicacidanylid)	Serva, Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Merck, Darmstadt
DMP-30 (2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-phenol)	Serva, Heidelberg
DNA-Standard „1kb-Ladder“	Promega, Mannheim
DTT (1,4-Dithiothreitol)	GibcoBRL, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
EGTA(Ethylenglycol-bisaminoethylether-tetraacetat)	Serva, Heidelberg
Eosin Farbstoff	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ficoll Typ 400	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Formvar	Plano, Wetzlar
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycidether 100	Serva, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HBSS (Hank's balanced salt solution)	GibcoBRL, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Serva, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonat	

Isobutanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Methylnadicanhydrit (MNA)	Serva, Heidelberg
Milchpulver (Frema-Reform)	Granovita, Lüneburg
Na-Cacodylat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat (NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg
Polyacrylamid (PAA) 30%	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor „Complete mini“	Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz
Salzsäure (HCl)	Serva, Heidelberg
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Taq-Polymerase Puffer	Promega, Mannheim
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trinatriumvanadat-trihydrat (Na ₃ VO ₄)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl Base	Roth, Heidelberg
TritonX-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck, Darmstadt
Tween 80	Fluka, Buchs, Schweiz
Uranylacetat	SPI-Chem, West Chester, USA
Western-Blot Protein-Standard „Dual-Color“	Bio-Rad, München
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Amersham Hybond-P PVDF Membrane	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Aqua-Polymount	Polysciences Europe, Eppelheim
chirurgische Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg
CO ₂ -Gas	Messer-Griesheim, Krefeld
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Eukitt, histologisches Einschlussmittel	Kindler, Freiburg
Falconröhrchen Rundboden 6 ml	Becton&Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falconröhrchen, Größe: 15ml, 50 ml	Becton&Dickinson, Franklin Lakes, USA
Injektionskanülen, Größe: 23G	Becton & Dickinson, USA
Kupfer-Grids	Agar-Scientific, UK
Objektträger „Superfrost plus“	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, USA
PCR-Mikrotiterplatten	ABgene, Surrey, UK
PCR-Plattenfolie „Air Pore Sheet“	ABgene, Surrey, UK
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts, San Diego, USA

Schere, gebogene scharf/scharfe
 Schere, gerade scharf/stumpf
 Spritzen „NormInjekt“, 1ml
 Trockeneis
 Versiegelungsstift „PapPen“
 ECL-Film „Amersham Hyperfilm“
 Western Lightning Plus-ECL Kit

Fine Science Tools, Heidelberg
 Fine Science Tools, Heidelberg
 Henke Saas Wolf, Tuttlingen
 Messer-Griesheim, Krefeld
 Dako, Glostrup, Dänemark
 GE Healthcare, U
 PerkinElmer inc., MA, USA

2.1.3 Geräte

Agarose-Gelkamm

Werkstatt des MPI für experimentelle
 Medizin, Göttingen

Agarose-Gelkammer

Werkstatt des MPI für experimentelle
 Medizin, Göttingen

Agarosegeldokumentation „ImageMaster VDS“

Amersham Pharmacia Biotech,
 Freiburg

Binocular

Leica Microsystems, Wetzlar

Diamantmesser „Histo HI 4317“

Diatome U.S., Fort Washington, PA, USA

Digitalkamera „C14 Resolution“ für Lichtmikroskop

Leica Microsystems, Wetzlar

Entwickler „Kodak X-omat 1000“

Kodak, Rochester, USA

Feinwaage, digital

Heraeus Instruments, Langenselbold

Feuchte Kammer

Werkstatt des MPI für experimentelle
 Medizin, Göttingen

Filmbox 18x24 cm

INTAS, Göttingen

Flachbettscanner „Astra 4500“

Umax Systems, Willich

Fräse für Epon-Präparate

Reichert, Wien, Österreich

Gefrierschrank -20° C

Liebherr, Ochsenhausen

Gefrierschrank -80°C

New Brunswick Scientific, Nürtingen

Gelgießvorrichtung „Mini-Protean“

Bio-Rad, München

Gelkämme (10 well, 1,5 mm) „Mini-Protean 3“

Bio-Rad, München

Gelkammer für Western Blot „Mini-Protean 3“

Bio-Rad, München

Gewebe-Einbettautomat „Lynx el“

Vision BioSystems Inc,
 Norwell, MA USA

Gewebehomogenisierer „Ultraturrax T8“

IKA Labortechnik, Staufen

Gewebeinfiltrationsautomat „Microm HMP 110“

Leica Microsystems, Wetzlar

LM-Mikroskop „Leica DM RXA“

Leica Microsystems, Wetzlar

Magnetrührer „IKA-Combimag“

IKA Labortechnik, Staufen

Mauskäfige

Tecniplast, Buguggiate, Italien

Mikrotiterplatten-Lesegerät „ThermoMax“

Molecular Devices, GMI inc., Ramsey,
 USA

Mini Protean 3 gel and transblot system

Bio-Rad Laboratories, München

Paraffin-Ausgießstation

Leica Microsystems, Wetzlar

PCR-Thermocycler „T3“

Biometra, Göttingen

PCR-Versiegler „Combi Thermosealer“

Advanced Biotechnologies, Surrey, UK

Peristaltikpumpe „SR70“

Heraeus Instruments, Langenselbold

Pipetten, Größen: 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl

Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich

Probenmischgerät „Vortexer“

Bender & Hobein, München

Reinstwasseranlage „Arium 611“

Zentrifugen

Schlittenmikrotom „Microm HM 400“

Sartorius, Göttingen

Spannungsgeräte Elektrophorese

Leica Microsystems, Wetzlar

Amersham Pharmacia Biotech,
 Freiburg

Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop „LEO EM912“	Carl Zeiss SMT GmbH, Oberkochen
Ultramicrotom „Ultracut S“	Leica Microsystems, Wetzlar
Videomikroskopie-Kamera	Hamamatsu, Herrsching
Vortex „Genie2“	Bender und Hobein AG, München
Zentrifuge „5415C“	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Heraeus Biofuge 13“	Heraeus Instruments, Langenselbold
Zentrifuge „Laboratory Centrifuge 4K15“	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz

2.1.4 Lösungen und Puffer

2.1.4.1 Molekularbiologie

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%
Ficoll (Typ 400)	15% in H ₂ O

PBS (10x Stammlösung, 1000ml)

Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	7,2 g
NaCl	100 g
KCl	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g

auffüllen auf 900 ml mit ddH₂O; pH 7,2 mit 10 N NaOH einstellen; mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen; autoklavieren; Stammlösung 1:10 verdünnen (1x PBS).

Lysis Buffer G, Binding Buffer T, Wash Buffer, Elution Buffer D
(Teile des „Invisorb spin tissue mini kit“)
Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben

Invitex, Berlin

TAE (50x, 1000ml)

Tris-HCl Base	242 g
Essigsäure 100%	57,1 ml
EDTA (0,5 M pH 8)	100 ml

mit H₂O auf 1000 ml auffüllen

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
EDTA (0,5 M)	1 mM

in H₂O

2.1.4.2 Proteinbiochemie

SDS-Probenpuffer (5x)

SDS	10%
Dithiothreitol	10mM
Glyzerin	20%
Tris-HCl	0.2 M
Bromphenolblau	0,005%

Protein-Lysis-Puffer (1x)

Tris-HEPES, pH 7,5	50mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1,5mM
EGTA	5,0 mM
Glyzerin	10%
TritonX-100	1%

Phosphatase- und Proteinaseinhibitoren

Na ₃ VO ₄	2mM
Complete mini Tablets (Hoffmann-LaRoche)	1 Tablette auf 10 ml
Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren vor Benutzung hinzugeben	

Sammelgel-Puffer (4x)

Tris-HCl, pH 6,8	0,5M
SDS	0,4%

Trenngel-Puffer (4x)

Tris-HCl, pH 8,8	1,5M
SDS	0,4%

12% Polyacrylamid-Trenngel (für 2x1,5mm Gele)

H ₂ O	9,1 ml
30% Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (29:1)	5,0 ml
4x Trenngel-Puffer (4x) (s.o.)	4,7 ml
10% Ammoniumperoxidsulfat (APS)	50 µl
TEMED	10 µl

0,13% Polyacrylamid-Sammelgel (für 2x1,5mm Gele)

H ₂ O	3,05
30% Bisacrylamid / Bisacrylamid (29:1)	650 µl
4x Sammelgel-Puffer (s.o.)	1,25 ml
10% Ammoniumperoxidsulfat (APS)	25 µl
TEMED	10 µl

Das noch flüssige Trenngel wurde den Herstellerangaben (Bio-Rad) folgend zwischen jeweils eine abgedichtete 1,5 mm-Platzhalter- und Deckglasplatte gegossen, so dass 2/3 des Platzes zwischen den Platten gefüllt wurde. Der obere Gelrand wurde mit 1 ml Isobutanol gleichmäßig übergossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Polymerisierung inkubiert. Danach wurde das Isobutanol 3 Mal mit ddH₂O vom jetzt festen Gelrand abgewaschen und der Zwischenraum mit Filterpapier getrocknet. Das frisch-zubereitete Sammelgel wurde eingefüllt und ein 1,5 mm Teflon-Kamm wurde in das noch flüssige Gel gedrückt um nach Polymerisierung 10 gelfreie Kammerräume im fertigen Gel zu erhalten. Nach 1 Stunde

Inkubation bei Raumtemperatur konnte das Gel mit Proteinlösung geladen werden.

Laemmli-Laufpuffer (10x)

Tris-Base	250mM
Glyzin	1.92M
SDS	1%

100ml mit 900ml ddH₂O auffüllen

Transfer Puffer (1x)

Tris	48mM
Glyzin	39mM
Methanol	20%
SDS	0.1 %

Blocking-Puffer (1x)

Tris-Base (mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen)	50mM
NaCl	150mM
Milchpulver	2%
Tween-20	0,05%

Wasch-Puffer (1x)

Tris-Base (mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen)	50mM
NaCl	150mM
Tween-20	0,02%

2.1.4.3 Histologie

Fixativ für die Paraffineinbettung

PFA 40 g (4%)

auf 500 ml mit H₂O auffüllen; auf 60°C erhitzen und tropfenweise 1M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird; 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer zugeben; steril filtrieren; auf pH 7,2 einstellen

Fixativ für die Elektronenmikroskopie (Karlsson und Schultz 1965)

NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	0.2M
Na ₂ HPO ₄	0.2M
PFA	4%
Glutaraldehyd (25%)	2,5%

PFA (8%) zubereiten (s.o.) und mit Phosphatpuffer mischen, dann Glutaraldehyd hinzugeben.

Kunstharzmischung Epon (Luft 1961)

Epon Lösung A

Glycidether	67,5 g
DDSA	88,2 g

Epon Lösung B

Glycidether	82,3 g
MNA	73,3 g

eine Stunde mit Magnetrührer rühren

Gebrauchslösung Epon

Lösungen A + B 1 : 1 mischen; dann Hinzugabe 1,8% DMP30

Methylen-Azur-II-Färbelösung (Richardson et al. 1960)

Methylenblau-Lösung: 1% Methylenblau in 1% wässriger Boraxlösung

Azur-II-Lösung: 1% Azur II in H₂O

in einem Verhältnis von 1 : 1 mischen

Natrium-Cacodylat-Puffer (0,08 M) pH 7,2

Natrium-Cacodylat (8,56 g) auf 500 ml ddH₂O auffüllen; auf pH 7,2 einstellen; steril filtrieren

Paraformaldehydlösung (8%)

Paraformaldehyd (40 g) auf 500 ml ddH₂O auffüllen, auf 60°C erhitzen, 1 M NaOH bis zum Aufklaren zugeben, steril filtrieren, auf pH 7,2 einstellen mit 1 M HCl

Phosphatpuffer

Lösung A

NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	6,9 g (0,2 M)
in 250 ml H ₂ O	

Lösung B

Na ₂ HPO ₄	28,4 g (0,2 M)
in 1000 ml H ₂ O	

Lösung A	196 ml
----------	--------

Lösung B	804 ml
----------	--------

mischen und mit pH 7,4 einstellen

Citratpuffer:

Stammlösung A

Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O)	21,01 g (0,1M)
in 1000 ml ddH ₂ O	

Stammlösung B

Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ *2H ₂ O)	29,41 g (0,1 M)
in 1000 ml ddH ₂ O	

Stammlösungen bei 4°C lagern

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml ddH₂O

Man erhält 0,01 M Citratpuffer pH 6,0 (immer frisch ansetzen)

2.1.5 Enzyme

Proteinase K (Lyophilisat; auf 10 U/μl lösen)

Invitex, Berlin

Taq-DNA-Polymerase "Sigma-REDTaq"

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

2.1.6 Reaktionskomplettsysteme

Invisorb spin tissue mini kit	Invitex, Berlin
PCR-Komplettsatz	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteinaseinhibitor „Roche Tablets“	Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz

2.1.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer Mannheim, Mannheim
DNA-Größenmarker „1kb Ladder“	Promega, Mannheim
Nonamer-primer	F. Benseler, MPI für exp. Med., Göttingen

2.1.8 Oligonukleotide

Primeroligonukleotide wurden wie beschrieben (Lappe-Siefke et al. 2003; Lesche et al. 2002) von F. Benseler (Abt. 501 des MPI für exp. Medizin, Göttingen) hergestellt.

Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere:

<i>Cnp1</i> -Cre:	
CNP-E3sense (C1)	5'-GCC TTC AAA CTG TCC ATC TC-3'
Puro3 sense (C2)	5'-CCC AGC CCT TTT ATT ACC AC-3'
CNP-E3antisense (C3)	5'-CAT AGC CTG AAG AAC GAG A-3'
PTEN ^{flox} :	
Forward-Primer (P1)	5'-ACT CAA GGC AGG GAT GAG C-3'
Reverse-Primer (P2)	5'-AAT CTA GGG CCT CTT GTG CC-3'
Reverse-Primer (P3)	5'-GCT TGA TAT CGA ATT CCT GCA GC-3'

2.1.9 Antikörper

Antikörper für die Immunhistochemie:	Verwendete Konzentration:	Bezugsquelle:
Anti-phospho-AKT (pRb)	1:50	Cell-Signaling Tech., Danvers, USA
Anti-Peripherin (pRb)	1:200	Millipore Bioscience, Billerica, USA
Anti-MPZ (Anti-P0) (mM)	1:1000	J. Archelos, Universität Graz, Österreich
Anti-MAG (mM)	1:200	(Chemicon) Millipore Bioscience, Billerica, USA
Anti-Dlg1 (pRb)	1:200	A. Bolino, Dulbecco Telethon Institute, Milano, Italien
Anti-Par3	1:200	T. Pawson, Samuel Lunenfeld, Research Institute, Toronto, Canada
<i>Sekundärantikörper:</i>		
Anti-Cy2	1:100	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

Anti-Cy3	1:1000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Antikörper für die Proteinbiochemie:	Verwendete Konzentration:	Bezugsquelle:
Anti-S6 (mRb)	1:1000	Cell-Signaling Tech., Danvers, USA
Anti-phospho-S6 (mRb)	1:1000	Cell-Signaling Tech., Danvers, USA
Anti-PTEN (pRb)	1:500	Biosource, Life Technologies, Darmstadt
Anti-phospho-AKT (mRb)	1:1000	Cell-Signaling Tech., Danvers, USA
Anti-AKT (mRb)	1:1000	Cell-Signaling Tech., Danvers, USA
Anti-Actin (mM)	1:1000	Millipore Bioscience, Billerica, USA
Sekundärantikörper:		
HRP-Anti-Rabbit	1:5000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
HRP-Anti-Mouse	1:5000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.1.10 Versuchstiere

CNP-Cre Mutanten:

generiert von Lappe-Siefke und Nave (MPI für exp. Medizin, Göttingen) (Lappe-Siefke et al. 2003)

PTEN^{flox/flox}-Mutanten:

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Groszer und Wu (Howard Hughes Medical Institute, UCLA School of Medicine, Los Angeles, USA) (Lesche et al. 2002)

2.1.11 Software

Excel 2003	Microsoft Europe, Berlin
Illustrator CS3	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Openlab 3.1.1	Improvisation, Heidelberg
Photoshop CS2	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
ImageJ Software, Version 1.37 mit Plug-In „Cell-Counter“	http://rsb.info.nih.gov/imagej
ImageJ Plug-In „G-Ratio“	Ingo Bormuth (http://gratio.efil.de)
Word 2007 / 2010	Microsoft Europe, Berlin
Graphpad prism Version 4.03	Graphpad Software Inc., CA, USA
QuantityOne	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse von Versuchstieren

2.2.1.1 Generierung von Versuchstieren

Für die vorliegende Arbeit wurden zuvor generierte Mausmutanten aus der Zucht des Max Planck Instituts für experimentelle Medizin, welche die Cre-Recombinase unter der Kontrolle des *Cnp1*-Promotors exprimieren (Lappe-Siefke et al. 2003), mit den ebenfalls zuvor beschriebenen *Pten^{flox/flox}*-Mäusen (Lesche et al. 2002) verpaart. Die Mäuse wurden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf genomischer DNA genotypisiert, die aus Schwanzbiopsien der Tiere gewonnen wurde (s.u.).

2.2.1.2 Entnahme von Schwanzbiopsien zur Genotypisierung

Die Versuchstiere wurden durch Entnahme von Schwanzbiopsien genotypisiert. Diese erfolgten beim Absetzen vom Muttertier. Ein ca. 0,25 cm langes Stück der Schwanzspitze wurde mit einer Schere abgetrennt und in einem „Eppendorf-Tube“ bei -20° C gelagert.

2.2.1.3 Narkotisierung und Tötung von Versuchstieren

Zur Vorbereitung der Perfusionsfixierung zur histologischen Probengewinnung erfolgte eine intraperitoneale Injektionsnarkose mit 0,2ml/10g Körpergewicht Avertin. Zur molekularbiologischen Probengewinnung wurden die Mäuse mit CO₂ betäubt und durch Genickbruch getötet.

2.2.1.4 Präparation der Gewebeproben von Versuchstieren

Den getöteten Versuchstieren wurde der Nervus Ischiadicus exzidiert. Es wurde die Haut über der Hüfte und über dem proximalen Teil der unteren Extremität abpräpariert und die Muskulatur freigelegt. Durch teilweise Entfernung der Glutealmuskulatur und der autochthonen Rückenmuskulatur wurde der Nervus Ischiadicus freigelegt und proximal nach Austritt aus dem Foramen infrapiriforme sowie distal auf Höhe der Aufteilung in Nervus tibialis und Nervus peroneus durchtrennt.

Nerven, die für die molekularbiologische Aufarbeitung bestimmt waren, wurden in flüssigem Stickstoff auf -80°C schockgefroren.

Nerven zur histologischen Analyse wurden nach Präparation in jeweiligem Fixativ nachfixiert oder erst nach Ganzkörperperfixation (s.u.) präpariert, reseziert und in Fixativ auf 4°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von genomischer DNA

Zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse wurde genomische DNA der Tiere gewonnen. Mit Hilfe des „Invisorb spin tissue mini kit“ (Invitex) wurde nach dem Protokoll des Herstellers genomische DNA aus den Schwanzbiopsien (s.o.) extrahiert:

Die bei -20°C gelagerten Biopsien wurden aufgetaut und eine Mischung aus „Lysis-Buffer G“ (400µl) und „Proteinase K (40µl)“ wurde zugegeben. Die Lyse des Gewebes durch die Proteinase erfolgte nach intensivem Mischen durch Inkubation über Nacht bei 52°C. Am nächsten Tag wurden die Proben durch Zentrifugation (12000 rpm für 2 min) und Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorf-Tube von unverdauten Rückständen befreit. „Binding Buffer T“ (200µl) wurde hinzugegeben. Diese Lösung wurde in ein neues „Tube“ mit einer eingesetzten Silicamembran überführt und bei 12000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Silicamembran mit der DNA wurde 2 Mal mit „Wash-buffer“ (550µl) für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert und eine drittes Mal ohne Puffer für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert, um Rückstände von Ethanol zu entfernen. Abschließend wurde die Silicamembran in ein neues „Tube“ überführt und der auf 52°C vorgewärmte „Elution Buffer D“ (200µl) pipettiert. Nach Inkubation für 3 min wurde die DNA durch Zentrifugation bei 9500 rpm aus der Membran in den Puffer gelöst.

2.2.2.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA

Durch die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich *in vitro* kleine Mengen DNA schnell zu vermehren und sie analysierbar zu machen (Mullis et al. 1986). Die hitzestabile DNA-Polymerase des Bakteriums „*Thermus aquaticus*“ (Taq-Polymerase) synthetisiert von sequenzspezifisch den Ausgangsstrang bindenden Oligonukleotiden (Primern) ausgehend einen zum denaturierten Ausgangsstrang komplementären DNA-Strang. Das Temperaturoptimum dieses Enzyms liegt bei 72°C. Spezifische DNA-Abschnitte werden durch zyklische Wiederholung von verschiedenen Reaktionsschritten vervielfältigt: DNA-Denaturierung bei 95°C, Binden der Primer bei 56°C (sog. Annealing) und Neusynthese der DNA-Abschnitte ab den jeweiligen Primern bei 72°C (sog. Elongation).

Zur Genotypisierung der *Pten*-Mutanten war es notwendig die genomische DNA der Mäuse sowohl auf das Vorhandensein von *Pten*^{flox}- als auch von *Cnp1*^{Cre}- Insertionen zu prüfen, um die Tiere in Mutanten- und Kontrollgruppen einzuteilen. Für die Reaktionen wurde ein PCR-Komplettansatz (Sigma) verwendet in einem Reaktionsvolumen von 20 µl pro DNA-Probe. Zur Detektion des von Flox-Kassetten flankierten Exon 5 des *Pten*-Gens wurde folgender Reaktionsansatz mit vorbeschriebener Primer-Kombination verwendet (Lesche et al. 2002):

- 1 µl genomische DNA
- 2 µl 10x PCR-Puffer (Sigma)
- 2 µl dNTPs (je Nukleotid f.c. 200 µM)
- 0,5 µl PTEN Forward-Primer (P1) (f.c. 300 nM)
- 0,5 µl PTEN Reverse-Primer (P2) (f.c. 300 nM)
- 0,5 µl PTEN Reverse-Primer (P3) (f.c. 300 nM)
- 1 µl Taq DNA-Polymerase (Red taq) (f.c.1,6 U / 50 µl)
- 12,5 µl ddH₂O

Die DNA-Amplifikation erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

3 min – 95 °C
30 s – 60°C
60 s – 72°C
30 s – 95°C 36 Zyklen
60 s – 60°C
10 min – 72°C
Pause - 4°C

Zur Detektion des *Cnp1^{Cre}*-Insertion in den Exonen 1-3 des *Cnp1*-Gens wurde folgender Reaktionsansatz mit vorbeschriebener Primerkombination (Lappe-Siefke et al. 2003) verwendet:

1 µl genomische DNA
2 µl 10x PCR-Puffer (Promega)
2 µl dNTPs (je Nukleotid f.c. 200 µM)
0,5 µl *Cnp1*-Exon3sense Forward-Primer (C1) (f.c. 300 nM)
0,25 µl Puro3 2nd Forward-Primer (C2) (f.c. 300 nM)
1,125 µl Cnp5'EcolN2 Reverse-Primer (C3) (f.c. 300 nM)
1 µl Taq DNA-Polymerase (f.c.1,6 U / 50 µl)
12,125 µl ddH₂O

Die DNA-Amplifikation erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

3 min – 95°C
30 s – 50°C
90 s – 72°C
60 s – 95°C 35 Zyklen
60 s – 60°C
10 min – 72°C
4°C - Pause

2.2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese von PCR Produkten

Um die DNA-Fragmente nach der PCR-Amplifikation ihrer Größe nach aufzutrennen und darzustellen, wurde die Technik der Agarosegel-Elektrophorese verwendet. In 1x TAE-Puffer wurde 4% Agarose durch Aufkochen gelöst und 1µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Die noch flüssige Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Gelkamm wurde angebracht, um Aussparungen in Form von Geltaschen zu erhalten. Das verfestigte Gel wurde in eine Laufkammer platziert und mit TAE-Laufpuffer überdeckt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Größenmarker wurde ein DNA-Standard („1kb-Ladder“, Promega) in die letzte Geltasche gefüllt. Es wurde eine Spannung von 30-180V (5-10 V /cm) angelegt, abhängig von der darzustellenden Fragmentgröße. Das

Ethidiumbromid, das mit der DNA der Proben interkaliert, ermöglicht eine Sichtbarmachung und Fotodokumentation der DNA-Fragmente unter dem UV-Illuminator. Die Größe der amplifizierten Fragmente lässt sich unter Zuhilfenahme der bekannten Fragmentgrößen des DNA-Standards abschätzen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Erstellung von Protein-Lysaten aus Nervpräparaten

Die schockgefrorenen Ischias-Nerven (s.o.) wurden in 400 µl Protein-Lysis-Puffer unter Zuhilfenahme des Gewebe-Homogenisierers „Ultraturrax T8“ (IKA) für 20-30s in der höchsten Stufe homogenisiert und auf Eis gelagert. Zelluläre Rückstände wurden entfernt, indem die Lysate bei 11000g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen bis zur weiteren Verarbeitung gelagert bei -70°C gelagert.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate gemessen unter Benutzung des „DC Protein Assay Kit“ (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers für das „Microplate assay“ Protokoll. Jeweils 5 µl Lysat wurden mit Fertiglösungen des Kits zusammen mit Proteinstandardlösungen in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Konzentrationen wurden bei einer Absorption von 650nm Wellenlänge in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Molecular-Devices) gemessen. Das Prinzip dieser Messmethode wurde von Lowry im Jahr 1951 erstmals beschrieben (Lowry et al. 1951): Die Methode basiert auf zwei Reaktionsschritten: Erstens auf einer Komplexbildung der Peptidbindungen der zu vermessenden Proteine mit den Kupfer(II)-Ionen einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung, die im zweiten Schritt zu Kupfer(I)-Ionen reduziert werden. Diese Kupfer(I)-Ionen reduzieren wiederum ein gelbes Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau. Die resultierende Blaufärbung kann bei 750nm, 650nm oder 540 nm vermessen werden und korreliert mit der zu bestimmenden Proteinkonzentration.

2.2.3.3 Separation der Proteine durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde von Laemmli erstmals beschrieben (Laemmli 1970). Die Protein-Lysate wurden ihrer zuvor bestimmten Konzentration (s.o.) entsprechend mit ddH₂O und SDS-Probenpuffer (5x) mit 2%-Beta-Mercaptoethanol auf eine Menge von 40 µg in 40µl verdünnt. Das β-Mercaptoethanol erleichtert eine Lösung der Disulfid-Brücken durch seine stark reduzierende Eigenschaft. Das SDS bindet die Proteine in einem konstanten Verhältnis von 1,4/1g und unterbricht somit nicht-kovalente Bindungen des Proteins. Die SDS-Bindung führt zu einer gleichen negativen Ladungsdichte aller Proteine. Die Proteinlösungen in Probenpuffer wurden im Folgenden bei 95°C für 6 Minuten inkubiert. Dieser Schritt soll in Verbindung mit dem SDS eine Denaturierung, also einen Aufbruch ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur sowie einen Verlust ihrer biologischen Aktivität bewirken. 12%-Polyacrylamid-Gele (siehe 4.2.1) wurden mit einer Vorrichtung (Mini Protean 3, BioRad) in eine mit Laemmli-Laufpuffer gefüllte Gelkammer gespannt. Der Teflon-Kamm wurde entfernt, die Geltaschen mit einer Pipette freigespült und mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden in die

Geltaschen jeweils die vorbereiteten 40 µl Proteinlösung in Probenpuffer pipettiert; in eine übrige Geltasche wurde 8µl Proteinstandard pipettiert. Um die gleichmäßig-negativ geladenen Proteine durch das Gel wandern zu lassen, wurde zuerst eine Gleichstromspannung von 70V angelegt bis das sichtbare Bromphenolblau des Probenpuffers die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel überschritten hatte. Die Proteine befanden sich nun auf einer Höhe gesammelt im dichteren, höher prozentigen Trenngel und der Gleichstrom wurde auf 100V erhöht. Die wandernden Proteine trennen sich nun ihrem Molekulargewicht nach im Trenngel auf. Dies wird dadurch bewirkt, dass Proteine mit einem höheren Molekulargewicht aufgrund der gleichen negativen Ladungsdichte aller Proteine langsamer durch das Gel wandern, als leichtere Proteine. Nachdem das Bromphenolblau circa 3,5 Stunden später das Gel am unteren Rand verlassen hat werden die Gele aus den Glasplatten genommen und für den Transfer auf PVDF-Membranen vorbereitet.

2.2.3.4 Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen (Western Blotting)

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel auf Membranen (Western Blotting) wurde von Towbin beschrieben (Towbin et al. 1979). Eine im Gegensatz zur Gelelektrophorese senkrecht zur Gelfläche angelegter Gleichstrom lässt die der Größe nach aufgetrennten Proteine durch das Gel hindurch auf eine Kunststoffmembran wandern, auf der sie durch elektrostatische und hydrophobische Kräfte verankert bleiben, um dann durch Antikörper detektiert werden zu können. Die Gele wurden nach der Elektrophorese zusammen mit den nötigen Materialien (pro Gel 2 Schwämme und 4 auf Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere) in Transferpuffer für 30 Minuten inkubiert. Die PVDF-Membranen (Amersham Bioscience) wurden auf Gelgröße zugeschnitten, beschriftet und für 2 Minuten in 100% Methanol aktiviert, bevor sie mit den übrigen Materialien für weitere 15 Minuten inkubiert wurde. Die Materialien wurden in der folgenden Reihenfolge in eine Kassette (Mini Protean3 transblot cassette, BioRad) gespannt: 1 Schwamm, 2 Filterpapiere, das Gel, die PVDF-Membran, 2 weitere Filterpapiere, 1 weiterer Schwamm. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden, falls notwendig wurden die Luftblasen ausgerollt. Jeweils 2 verschlossene Kassetten wurden mit einer Kühlbox und einem Rührmagnet in eine mit Transfer-Puffer gefüllte Blotting-Kammer (Mini protean3 transblot chamber, BioRad) eingesetzt. Die ganze Apparatur wurde auf einen Magnetrührer gestellt und es wurde ein konstanter Gleichstrom von 350 mA über eine Stunde bei Raumtemperatur angelegt.

2.2.3.5 Immundetektion der Proteine

Nach dem Blotvorgang wurden die Membranen entnommen und ohne zu trocknen in Blocking-Puffer überführt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die jeweiligen Primärantikörper wurden in angegebener Verdünnung in 5ml Blocking-Puffer gelöst und zusammen mit der Membran in einem 25ml Falcon-Röhrchen bei 4°C unter ständigem Rotieren für 12-16 Stunden über Nacht inkubiert.

Nachdem die Membran 3 Mal für 15 Minuten in 125ml Wasch-Puffer geschwenkt wurde, um die noch ungebundenen Antikörper abzuwaschen, folgte die Inkubation mit dem jeweils passenden an *horseradish peroxidase* (HRP) gebundenen Sekundärantikörper in angegebener Verdünnung

in Blocking-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur; auf gleiche Weise wie im Falle des Primärantikörpers.

Nach weiteren 3 Waschschritten (s.o.) wurde die Membran mit 1ml Chemilumineszenz-Reagenz (Western Lightning, PerkinElmer) für 1 Minute inkubiert und dabei mit Klarsichtfolie abgedeckt, um eine Austrocknung zu verhindern. Das Reagenz wird durch die an die Antikörper gebundene Peroxidase umgesetzt und emittiert – proportional zu der Konzentration an HRP – Licht, das auf einem Film Banden auf Höhe der jeweiligen Proteine bildet (Thorpe und Kricka 1986). Im nächsten Schritt wird das Reagenz abgetropft und die Membran zwischen 2 Klarsichtfolien in einer Filmkassette platziert. Es wurde darauf geachtet diese Schritte zügig durchzuführen und möglichst im Dunkeln zu arbeiten. Die Filmkassette wurde in der Dunkelkammer wieder geöffnet und ein ECL-Film (Amersham) aufgelegt. Der Film wurde für 30 Sekunden über der Membran in der geschlossenen Filmkassette belassen und danach in der Entwicklermaschine entwickelt. Je nach Stärke der danach beobachteten Banden wurden weitere Filme für kürzere oder längere Zeiträume auf der Membran belassen und entwickelt. Die Membranen wurden nach der Detektion in TBS-Puffer bei 4°C gelagert und konnten für die Detektion anderer Proteine wiederverwendet werden.

2.2.3.6 Densitometrische Bestimmung der Bandintensitäten

Um die Konzentration der jeweiligen Proteine (s.o.) auf den PVDF-Membranen zu quantifizieren wurden die entwickelten Filme in einem Flachbettscanner (Astra 4500, Umax) bei 300 dpi Auflösung unter Verwendung von Photoshop CS2 (Adobe) eingescannt und als TIFF-Datei in das Programm QuantityOne (BioRad) exportiert. Das Programm QuantityOne erlaubt eine Berechnung der Bandintensitäten auf Basis ihrer integrierten Grauwertdichten. Die Dichtewerte der einzelnen Banden (s.o.) wurden nach Excel 2003 (Microsoft) exportiert. Dort wurden sie in relative Bandintensitäten umgerechnet, indem die Bande des jeweiligen Proteins in Relation zur Actin-Bande derselben Probe gesetzt wurde. So wurde eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben unabhängig von der absoluten geladenen Proteinkonzentration erreicht. Im zweiten Schritt wurden Durchschnittsintensitäten aus Kontroll- und Mutantengruppen gebildet und die relative Intensität der Mutantengruppe als Dichteprozent der Kontrollgruppe in Balkendiagrammen abgebildet.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Perfusionsfixation von Versuchstieren

Nach Narkose und Anästhesie durch intraperitoneale Injektion von Avertin (s.o.), wurde der Thorax eröffnet, das Herz freipräpariert und mit einer 27G „Venofix“-Kanüle der linke Ventrikel punktiert. Weiterhin wurde die Vena cava inferior vor Einmündung in den rechten Vorhof eröffnet. Über die „Venofix“-Kanüle perfundierte eine Peristaltikpumpe (Heraeus SR70, Flussrate 0.7-1 ml/min) den Kreislauf der Versuchstiere mit HBSS bis sämtliches Blut ausgewaschen war. Darauf folgte die Perfusion mit 50 ml Fixativ für die Epon-Einbettung (Karlsson und Schultz 1965) oder 50 ml 4% PFA in Phosphatpuffer für die Paraffineinbettung. Somit wurde eine Ganzkörperfixation der Versuchstiere erreicht. Die zu untersuchenden

Gewebe wurden entnommen und bei Bedarf in jeweiligem Fixativ bei 4°C gelagert oder weiterverarbeitet.

2.2.4.2 Einbettung von Gewebe in Kunstharz

Die fixierten Gewebeproben wurden in das Kunstharz Epon nach beschriebener Methode (Luft 1961) eingebettet. Dazu wurden die Ischiasnerven aus den perfundierten Mäusen entnommen (s.o). Ein 0,5 cm langer Abschnitt wurde mit dem Skalpell unter einem Binocular (Leica Microsystems) aus dem Nerven so zugeschnitten, dass sich das proximale Ende auf immer gleicher Höhe circa 3 mm nach Austritt aus dem Foramen infrapiriforme vor der Aufspaltung in den Nervus tibialis und peroneus befand. Diese Präparate wurden in identischer Ausrichtung in die Körbchen des Einbettautomaten „Lynx El“ platziert und weiterbehandelt. Die Körbchen wurden bei 4°C wie im Folgenden beschrieben in die jeweiligen Lösungen getaucht:

Lösung	Dauer
Na-Cacodylat-Puffer	2 x 30 Minuten
1%-OsO ₄ / Osmiumtetroxid	2 Stunden
Na-Cacodylat-Puffer	2 x 15 Minuten
30%-Ethanol	15 Minuten
50%-Ethanol	15 Minuten
70%-Ethanol	15 Minuten
80%-Ethanol	15 Minuten
90%-Ethanol	15 Minuten
100%-Ethanol	2 x 15 Minuten
Isopropanol	15 Minuten
Propylenoxid	2 x 15 Minuten
Propylenoxid : Epon 2 : 1 Mischung	2 Stunden
Propylenoxid : Epon 1 : 1 Mischung	2 Stunden
Propylenoxid : Epon 1 : 2 Mischung	4 Stunden
Epon	4 Stunden

Nach Abschluss der Infiltration wurden die Proben in Epon eingebettet. Sie wurden in passende Ausgießformen platziert und flüssiges Epon wurde hinzugegeben. Die Proben wurden durch Erhitzen auf 60°C für 24 Stunden polymerisiert. Die entstandenen Epon-Kunstharzblöcke wurden mit einer Fräse (Reichert, Wien) zu einer Pyramidenform zugeschliffen.

2.2.4.3 Herstellung von Kunstharzschnitten für Licht- und Elektronenmikroskopie

Von den Epon-Blöcken (s.o.) wurden an einem Rotationsmikrotom mit einem Diamantmesser Schnitte der Dicke 0,5 µm (Semidünnschnitte) und 50-70 nm (Ultradünnschnitte) an anatomisch gleicher Stelle (s.o.) angefertigt. Für die Lichtmikroskopie wurden die Semidünnschnitte auf Objektträger transferiert und eine Stunde lang auf einer Heizplatte bei 60°C getrocknet. Für die Elektronenmikroskopie wurden die Ultradünnschnitte auf mit 1,25%-Formvar befilmte Kupfer-Grids übertragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.4.4 Methylenblaufärbung von Semidünnschnitten

Hergestellte Semidünnschnitte (s.o.) wurden unter Zuhilfenahme der Methylen-Azur-II-Färbung (Richardson et al. 1960) kontrastiert. Die Methylenblau-Lösung und die Azur-II-Lösung wurde auf die Objektträger mit Ischias-Nerven für eine Minute bei 60° appliziert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit Eukitt-Kleber eingedeckelt.

2.2.4.5 Kontrastierung von Ultradünnschnitten

Die Kupfer-Grids mit den Ultradünnschnitten wurden zur Kontrastierung auf Tropfen von 4% Uranylacetat in ddH₂O für 30 Minuten inkubiert, gefolgt von 12 Minuten Inkubation auf Tropfen von 12% Bleicitrat. Nach den zwei Kontrastierungsschritten folgten jeweils 3 Waschschrte mit 250 ml ddH₂O. Sämtliche Kontrastierungsschritte sowie die abschließende Trocknung für 30 Minuten erfolgten bei Raumtemperatur.

2.2.4.6 Herstellung von Paraffinschnitten

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die fixierten Gewebeproben in einem Gewebe-Infiltrationsautomaten (Leica Microsystems) durch Inkubation in aufsteigenden Alkohollösungen dehydriert und abschließend nach dem folgenden Schema paraffiniert:

50% Ethanol	1 Stunde
70% Ethanol	2 x 2 Stunden
96% Ethanol	2 x 1 Stunde
100% Ethanol	2 x 1 Stunde
Isopropanol	1 Stunde
Xylol	2 Stunden
Paraffin	2 x 2 Stunden bei 60°C

An einer Paraffinausgießstation (Leica Microsystems) wurden die Gewebeproben mit flüssigem Paraffin in Plastikkörbchen ausgegossen und auf einer Kühlplatte abgekühlt. Mit einem Schlittenmikrotom (Leica Microsystems) wurden 5-7 µm Dicke Schnitte hergestellt, die in einem Wasserbad bei 42°C ausgerichtet, auf Objektträger platziert und 12-16 Stunden über Nacht bei 37°C getrocknet wurden.

2.2.4.7 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Die getrockneten Schnitte (s.o.) wurden für 10 Minuten bei 60°C inkubiert und nach dem folgenden Schema deparaffiniert:

Xylol	2 x 10 Minuten
Xylol/Isopropanol (1:1)	10 Minuten
100% Ethanol	5 Minuten
90% Ethanol	5 Minuten
70% Ethanol	5 Minuten
50% Ethanol	5 Minuten
ddH ₂ O	5 Minuten

Zur Freilegung von Antigenbindungsstellen im Gewebe wurden die Schnitte für 5 Minuten in Citratpuffer bei Raumtemperatur äquilibriert, für 10 Minuten im gleichen Puffer in einem Mikrowellenofen bei 650 Watt gekocht und danach für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen, wurden die Schnitte für 5 Minuten in Trispuffer mit 2% Milchpulver und daraufhin für 1 Stunde in PBS mit 5% BSA in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden im Anschluss mit einem wasserabweisenden Stift (PapPen, Dako) an den Rändern versiegelt, so dass die waagrecht in der feuchten Kammer liegenden Schnitte mit bis zu 200 µl Antikörperlösung gefüllt werden konnten. Die Schnitte wurden mit 200 µl Primärantikörpern in angegebener Konzentration in PBS mit 5% BSA in der feuchten Kammer für 12-16 Stunden bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 3 Mal für 5 Minuten in Trispuffer mit 2% Milchpulver gewaschen und in der feuchten Kammer mit 200µl fluoreszierenden Sekundärantikörpern in angegebener Konzentration in PBS mit 5% BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger 3 mal 5 Minuten in Trispuffer gewaschen und mit Aqua-Polymount-Kleber (Polysciences) eingedeckt. Die in dieser Arbeit verwendeten Aufnahmen wurden an einem Lichtmikroskop (Leica DM RXA2) mit einer Fluoreszenzmikroskopie-Digitalkamera (C14, Leica) angefertigt.

2.2.4.8 Herstellung von Teased fibers

Die *Teased Fiber*-Technik erlaubt die histologische Darstellung und Färbung einzelner peripherer Nervenfasern mit zugehörigen Myelinscheiden in Längsansicht (Scherer et al. 1995). Die Ischias-Nerven wurden nach Ganzkörperfixierung der Versuchstiere herauspräpariert (s.o.) und für weitere 30 min in 4%-PFA in Phosphatpuffer nachfixiert. Anschließend wurden die Nerven in PBS überführt und sofort weiterverarbeitet. Unter einem Binokular wurde der Nerv an einem Ende mit einer Pinzette fixiert. Durch wiederholtes Streichen mit der Nadelspitze einer Injektionsnadel vom fixierten zum freien Ende wurde das Perineurium entfernt und die einzelnen Nervenfasern mit ihrer Myelinhülle isoliert. Wenn der Nerv ausreichend in einzelne Fasern aufgefächert erscheint, wird ein Abschnitt mit einem Skalpell abgeschnitten und mit der Nadel auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Menzel) mit einem Tropfen PBS transferiert. Mit zwei Nadeln wurde das Knäuel von Nervenfasern auseinandergezogen, so dass einzelne Fasern isoliert sichtbar wurden. Nachdem das PBS vollständig verdunstet war und die Nervenfasern auf dem Objektträger angetrocknet waren wurden die Objektträger für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und entweder weiterverarbeitet oder für die spätere Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die darauffolgende immunhistochemische Färbung erfolgte wie in 2.2.4.7 bereits beschrieben.

2.2.4.9 Färbung von Teased Fibers

Für die Darstellung der Internodien wurden die Objektträger mit den *Teased Fibers* (s.o.) für 15 min in 1% Osmiumtetroxid inkubiert und anschließend 3 Mal für 5 min in ddH₂O gewaschen. Nach jeweils 5 min in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 100% Ethanol) wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Für die Detaildarstellung der Schmidt-Lantermann-Inzisuren wurden die nach Ganzkörperfixierung präparierten Nerven wie in 2.2.4.8 beschrieben mit einer Nadelspitze bearbeitet, jedoch nicht auf einem Objektträger angetrocknet, sondern frei schwimmend – wie oben beschrieben – mit 1% Osmiumtetroxid und nachfolgender Alkoholreihe bearbeitet und mit Eukitt eingedeckt.

Die verschiedenen Proben wurden unter einem Lichtmikroskop mit Digitalkamera (Leica DM RXA2) fotografiert.

2.2.5 Morphometrische Analysen

Um die histologischen Auffälligkeiten der Schwanzzellen von Pten-Mutanten zu charakterisieren, wurden von den gefärbten Semidünnschnitten der Ischias-Nerven (s.o.) Aufnahmen an einem Lichtmikroskop (Leica DM RXA2) mit einer Videomikroskopie-Digitalkamera angefertigt. Der gesamte Querschnitt eines Ischiasnerven wurde an anatomisch gleicher Stelle für alle Präparate (s.o.) durch überlappende Einzelaufnahmen in 100x Vergrößerung fotografiert und die Einzelbilder unter Zuhilfenahme von Photoshop CS2 (Adobe) am Computer zu einer einzigen hochauflösenden Bilddatei fusioniert. In diesen Bilddateien wurden mit dem Programm ImageJ und dem Plug-in „Cell-counter“ (<http://rsb.info.nih.gov/imagej>, Version 1.37) myelinisierte Axone, Schwanzzell-Kerne und verschiedene Klassen von Myelin-Abnormitäten eines Ischias-Querschnitts markiert und automatisch gezählt. Außerdem konnte aus den Bilddateien die Gesamtquerschnittsfläche ermittelt werden.

Um eine Größenverteilung aller myelinisierten Axone zu schätzen, wurden pro Tier 10 zufällig über dem Gesamtquerschnitt verteilte Einzelbilder aufgenommen, auf denen der Durchmesser sämtlicher Axone mit ImageJ als Stichprobe gemessen wurde. Auf Basis der schon gezählten (s.o.) absoluten Anzahl von myelinisierten Axonen wurde die Größenverteilung für alle myelinisierten Axone aus der Stichprobe hochgerechnet.

Als weiteres Charakteristikum der Ischias-Nerven wurde der Quotient aus dem Durchmesser des Axons zu dem Durchmesser des Axons mit der dazugehörigen Nervenscheide gemessen. Dieser Quotient wird als *g-ratio* bezeichnet und ist dimensionslos. Bei einem Axon ohne Nervenscheide beträgt der Quotient 1, je dicker das Myelin wird, desto kleiner wird die *g-ratio*. Das Verhältnis von myelinisiertem Axon zur Dicke seiner Nervenscheide variiert geringer als die absolute Dicke einzelner Nervenscheiden von Axonen verschiedener Größe, so dass die *g-ratio* als Maß für die durchschnittliche Dicke der Nervenscheiden sinnvoll ist. Der Durchschnittswert der *g-ratio* im gemischten Nerven beträgt 0,68 (Friede und Bischhausen 1982). Pro Tier wurden in beschriebenen Bilddateien von kompletten Querschnitten eines Ischias-Nerven mit dem Programm ImageJ und dem Plug-In „G-ratio“ („<http://gratio.efil.de>“) 100 Axone randomisiert ausgewählt und die *g-ratio* ermittelt, indem nach manueller Markierung der Axon- und Myelengrenzen die *g-ratio* als Wurzel des Quotienten aus Axonfläche und Fläche des Axons mit zugehöriger Myelinscheide durch das Programm berechnet wurde.

Um die Unterschiede in Myelindicken von Axonen mit einem Durchmesser von weniger als 2 µm genauer zu messen wurden von kontrastierten Ultradünnschnitten circa 35 - 50 Axone pro Querschnitt mit dem Elektronenmikroskop (LEO EM912) fotografiert und – wie oben beschrieben – mit ImageJ vermessen.

2.2.6 Statistische Methoden

Alle in den Analysen erhobenen Daten wurden mit Excel 2003 bearbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software „Graphpad-Prism“. Bei der Analyse wurden die Ergebnisse mit dem „Student's t-test“ für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft. Sämtliche Fehlerbalken der dargestellten Balkendiagramme zeigen den jeweiligen Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM).

3 Ergebnisse

Die Entstehung der Myelinscheide in der Entwicklung wie auch deren Erhalt im Erwachsenenalter ist eng verknüpft mit den daran beteiligten intra- und extrazellulären Signalwegen. Die Erforschung dieser Signalwege ist daher essentiell, um ein besseres Verständnis der Myelinisierung im PNS und ihrer möglicherweise dysfunktionalen Rolle bei hereditären Neuropathien zu erhalten.

Das Ziel dieser Arbeit war die Rolle des PI3K-Signalwegs in Schwannzellen im Hinblick auf die Myelinisierung zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden Mausmutanten generiert, in denen das Gen für PTEN – eines negativen Regulators des PI3K-Signalwegs – konditional in Schwannzellen und Oligodendrozyten inaktiviert wurde (Pten-Mutanten) (Lappe-Siefke et al. 2003; Lesche et al. 2002). Diese Pten-Mutanten wurden in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Myelinisierung im PNS analysiert.

3.1 Herstellung der Pten-Mutanten

Zur Erzeugung der Pten-Mutanten wurden zwei bereits beschriebene Mauslinien miteinander gekreuzt:

In der einen Mauslinie (*Cnp1*^{Cre/WT}-Mutanten) ist das offene Leseraster des 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase- (*Cnp1*)-Gens, das nur in Schwannzellen und Oligodendrozyten aktiv ist, auf einem Allel durch die codierende Gen-Sequenz der Cre-Rekombinase ersetzt worden. Die heterozygote Inaktivierung von *Cnp1* auf nur einem Allel hat in dieser Mauslinie zu den analysierten Altersstadien keine phänotypische Ausprägung (Lappe-Siefke et al. 2003).

In der zweiten Mauslinie (*Pten*^{flox/flox}-Mutanten) wurden in nicht-codierenden Bereichen des *Pten*-Gens vor und nach Exon 5 loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase, inseriert (Lesche et al. 2002).

Nach Kreuzung dieser Mauslinien erhält man in der zweiten Generation sowohl *Cnp1*^{WT/WT}**Pten*^{flox/flox}-Tiere (Kontrollen) als auch *Cnp1*^{Cre/WT}**Pten*^{flox/flox}-Tiere (Pten-Mutanten). Die Pten-Mutanten exprimieren die Cre-Rekombinase, unter der Kontrolle des *Cnp1*-Promoters in Schwannzellen und Oligodendrozyten. In diesen Zellen bindet die Cre-Rekombinase an die loxP-Erkennungssequenzen und schneidet das Exon 5 des *Pten*-Gens aus dem Genom der Zelle (Abbildung 6), so dass kein funktionelles Protein mehr gebildet werden kann.

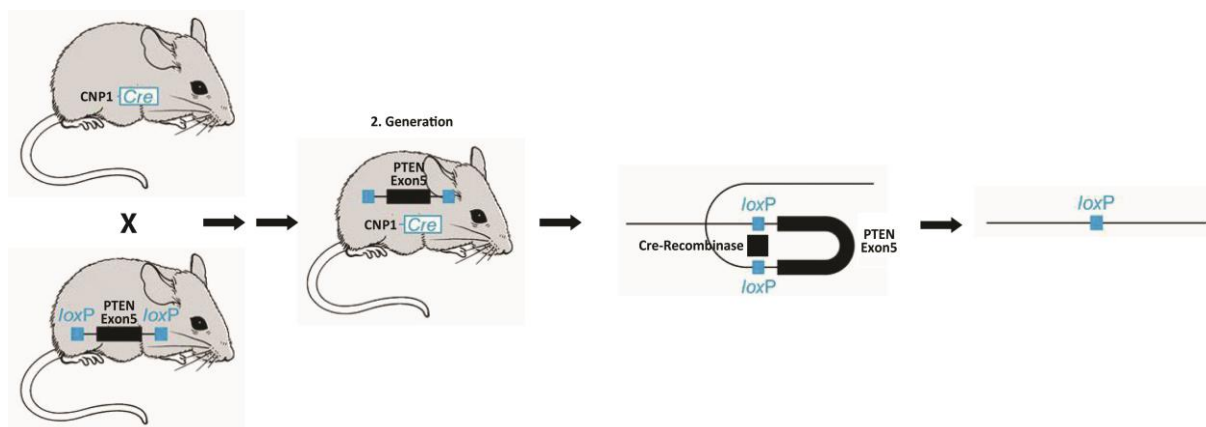


Abbildung 6: Konditionale Inaktivierung von PTEN in Schwanzzellen der Pten-Mutanten

Es wurde eine Mauslinie, in der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Cnp1*-Promotors exprimiert wird, mit einer Mauslinie, in der das Exon 5 des *Pten*-Gens von loxP-Erkennungssequenzen flankiert ist, verpaart. In zweiter Generation ergaben sich Nachkommen, die sowohl heterozygot für *Cnp1*^{Cre} als auch homozygot für PTEN^{lox} waren (*Cnp1*^{Cre/WT}**Pten*^{lox/lox}-Mutanten). In diesen Mäusen entfernte die Cre-Rekombinase das Exon 5 des *Pten*-Gens aus dem Genom der Schwanzzellen und Oligodendrozyten, was zum zelltyp-spezifischen Funktionsverlust von PTEN führte.

Modifiziert nach: Strachan (2005), Seite 698.

3.1.1 Nachweis von Rekombination in genomischer DNA

Um die Cre-spezifische Deletion von Exon 5 des *Pten*-Gens in den *Pten*-Mutanten auf DNA-Ebene nachzuweisen, wurde aus Ischias-Nerven DNA präpariert und bestimmte Abschnitte mittels PCR amplifiziert. Zur Unterscheidung von *Cnp1*^{WT}- von *Cnp1*^{Cre}-Allelen wurde ein Ansatz mit 3 Primern benutzt (Lappe-Siefke et al. 2003). Es ergaben sich zwei mögliche PCR-Produkte folgender Größen: 643 bp bei einem *Cnp1*^{WT}-Allel und 357 bp bei einem *Cnp1*^{Cre}-Allel (Abbildung 7A). Zum Nachweis der Deletion von Exon 5 des *Pten*-Gens in den *Pten*-Mutanten wurde ebenfalls ein PCR-Ansatz mit 3 Primern benutzt. Eine Detektion des *Pten*^{WT}-, des *Pten*^{lox}-Allels und der Nachweis der Cre-spezifischen Deletion von Exon 5 (*Pten*^{Del}) wurde so ermöglicht (Lesche et al. 2002). Mit dieser Primerkombination ergaben sich 3 mögliche PCR-Produkte mit folgenden Größen: 1000bp bei einem *Pten*^{lox}-Allel, 900 bp bei einem *Pten*^{WT}-Allel und 300 bp bei einem *Pten*^{del}-Allel (Abbildung 7B).

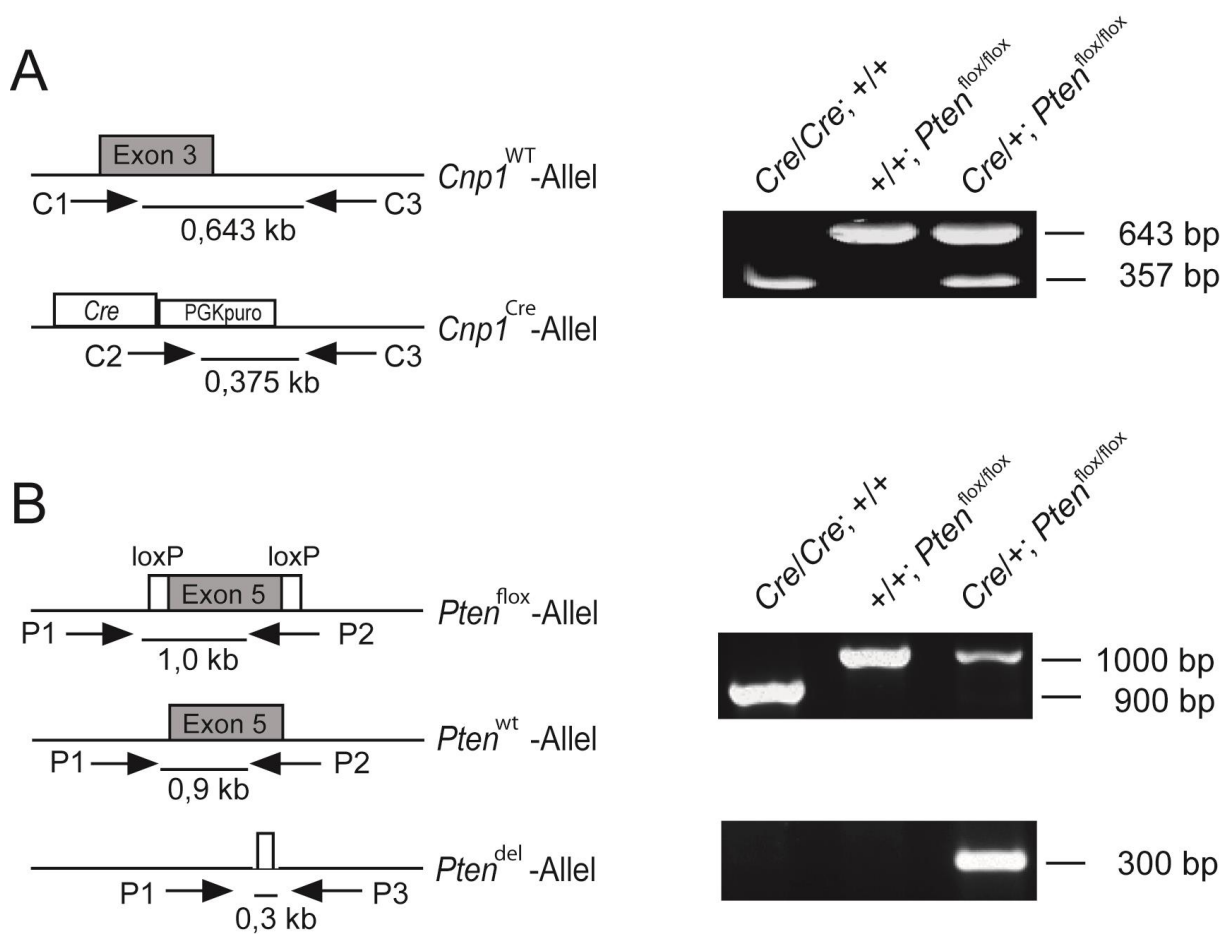


Abbildung 7: Genotypisierung und Nachweis der Cre-spezifischen Deletion in den Pten-Mutanten

A Die Detektion von *Cnp1*^{WT}- und *Cnp1*^{Cre}-Allelen erfolgte durch einen PCR-Ansatz mit 3 Primern (C1, C2 und C3). Im Fall der *Pten*-Mutanten (*Cre*/+;*Pten*^{flox/flox}) ergab sich ein verkürztes PCR-Produkt von 375 bp auf Grund der Cre- und Puromycin-Resistenzsequenz (PGKpuro). Im Fall der Kontrollen (+/+;*Pten*^{flox/flox}) ergab sich ein PCR-Produkt von 643 bp. Als Negativkontrolle wurde die DNA eines für *Cnp1*^{Cre} homozygoten Tiers (*Cre*/*Cre*;+/+) verwendet.

B Die Unterscheidung von wildtypischen (*Pten*^{WT}), mutanten (*Pten*^{flox}) und rekombinierten *Pten*-Allelen (*Pten*^{del}) erfolgte ebenfalls durch einen PCR-Ansatz mit 3 Primern (P1, P2 und P3). Im Fall der *Pten*-Mutanten (*Cre*/+;*Pten*^{flox/flox}) ergab sich ein PCR-Produkt von 300 bp auf Grund der Cre-spezifischen Rekombination mit Exzision von Exon 5 des *Pten*-Gens. Das schwache PCR-Produkt von 1000 bp führen wir auf nicht-rekombiniertes Gewebe (Axone und Bindegewebszellen) zurück. Im Fall der Negativkontrollen (*Cre*/*Cre*;+/+) wurde die Wildtyp-Sequenz von Exon 5 mit einem PCR-Produkt von 900 bp detektiert.

3.1.2 Reduktion von PTEN und Aktivierung des PI3K-Signalwegs

Die gewebespezifische Deletion von Exon 5 des *Pten*-Gens *in vivo* sollte in den Schwanzzellen zum Verlust von intaktem PTEN-Protein führen. Dieser Verlust von PTEN sollte daraufhin eine gesteigerte Aktivität des von PTEN regulierten PI3K-Signalwegs bewirken. Um den Verlust an PTEN nachzuweisen, wurden aus Ischias-Nerven von *Pten*-Mutanten und Kontrollen im Alter von 1,5 Monaten Protein-Lysate erstellt und Mittels Western-Blot analysiert (siehe 2.2.3) (Abbildung 8A). Die densitometrische Auswertung der PTEN-Banden ergab eine signifikante

Intensitätsminderung von 43% gegenüber den Kontrollen (relative Intensitäten: PTEN, Kontrollen: $1,000 \pm 0,09705$, Pten-Mutanten $0,5688 \pm 0,04693$; $p=0,0071$; $n=4$ pro Gruppe) (Abbildung 8B). Eine stärkere Reduktion von PTEN war nicht zu erwarten, da das Lysat ebenfalls nicht-rekombinierte Zelltypen wie Fibroblasten und Neurone enthielt.

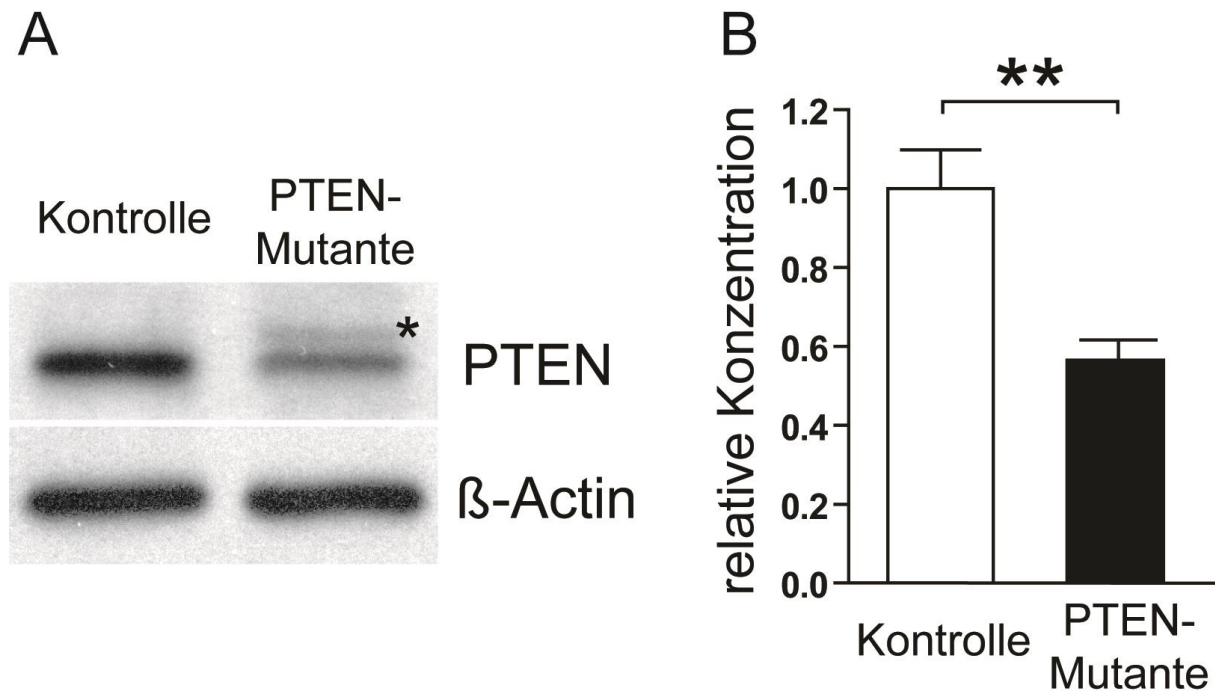


Abbildung 8: Reduktion der Bandintensitäten von PTEN in den Pten-Mutanten im Western-Blot

A Western-Blot Analyse der Lysate des Nervus Ischiadicus (links) für intaktes PTEN-Protein von Pten-Mutanten und Kontrollen. Die korrespondierenden Banden von β -Actin wurden als Ladungskontrolle verwendet. Die mit einem (*) gekennzeichnete Bande ist ein Residuum des p-AKT-Antikörpers, der zuvor mit derselben PVDF-Membran verwendet wurde.

B Densitometrische Quantifizierung der Bandintensitäten für PTEN in Protein-Lysaten aus Ischiasnerven von Pten-Mutanten und Kontrollen (** $p=0,0071$, $n=4$ pro Gruppe, Fehlerbalken zeigen SEM).

Weiterhin wurde die Aktivität zweier Effektorproteine des PI3K-Signalwegs, der Proteinkinasen AKT und S6, über die Bandintensitäten der jeweils phosphorylierten Form detektiert. Die Pten-Mutanten zeigten eine erhöhte Bandintensität sowohl von p-AKT als auch von p-S6 (Abbildung 9A). Eine Quantifizierung der Bandintensitäten ergab eine relative Steigerung der Konzentrationen für p-AKT um 134% und für p-S6 eine Steigerung um 53% gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 9B) (relative Intensitäten: p-AKT, Kontrollen $1,000 \pm 0,1413$, Pten-Mutanten $2,340 \pm 0,1008$, $p=0,0002$; p-S6, Kontrollen $1,000 \pm 0,1163$, Pten-Mutanten $1,529 \pm 0,07157$, $p=0,0082$; $n=4$ für alle Gruppen).

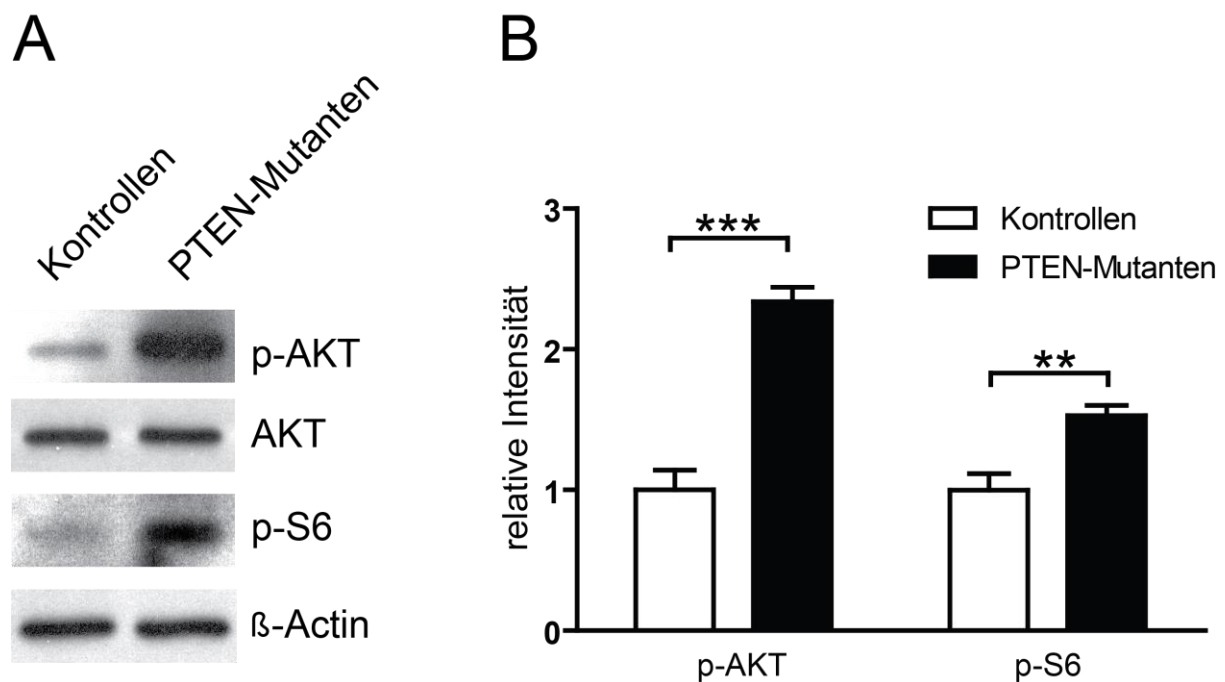


Abbildung 9: Gesteigerte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs in den Pten-Mutanten

A Die Western-Blot Analyse der Lysate des Nervus Ischiadicus für phosphoryliertes AKT (p-AKT) und phosphoryliertes S6 (p-S6). Als Ladungskontrolle diente die Detektion von β -Actin und unphosphoryliertem AKT.

B Densitometrische Quantifizierung der Bandintensitäten für p-AKT und p-S6 Protein-Lysaten aus Ischiasnerven von Pten-Mutanten und Kontrollen (p-AKT: $p^{***}=0,0002$; p-S6: $p^{**}0,0082$; $n=4$ pro Gruppe, Fehlerbalken zeigen SEM).

3.2 Analyse des Phänotyps der Pten-Mutante

3.2.1 Vergrößerung des betroffenen Gewebes

Nach Präparation des Nervus Ischiadicus der Versuchstiere ließ sich schon bei makroskopischer Inspektion ein Größenunterschied zwischen den Nerven der Pten-Mutanten und der Kontrollgruppe feststellen (Abbildung 10A). Die Nerven wurden in Epoxidharz eingebettet und an anatomisch gleicher Stelle (weiße Balken in Abbildung 10A) geschnitten. Die Gesamt-Querschnittsfläche wurde vermessen. Es zeigte sich im Alter von 1 Monat ein signifikanter Unterschied der Querschnittsflächen, der im Alter von 3 Monaten noch zugenommen hatte (Querschnittsflächen; 12 Tage: Kontrollen $59140 \mu\text{m}^2 \pm 8516$, Pten-Mutanten $91080 \mu\text{m}^2 \pm 9327$, $p=0,0648$; 1 Monat: Kontrollen $93660 \mu\text{m}^2 \pm 3842$, Pten-Mutanten $160900 \mu\text{m}^2 \pm 22900$, $p=0,0443$; 3 Monate: Kontrollen $137500 \mu\text{m}^2 \pm 7187$, Pten-Mutanten $272300 \mu\text{m}^2 \pm 18330$, $p=0,0024$; $n=3$ für alle Gruppen).

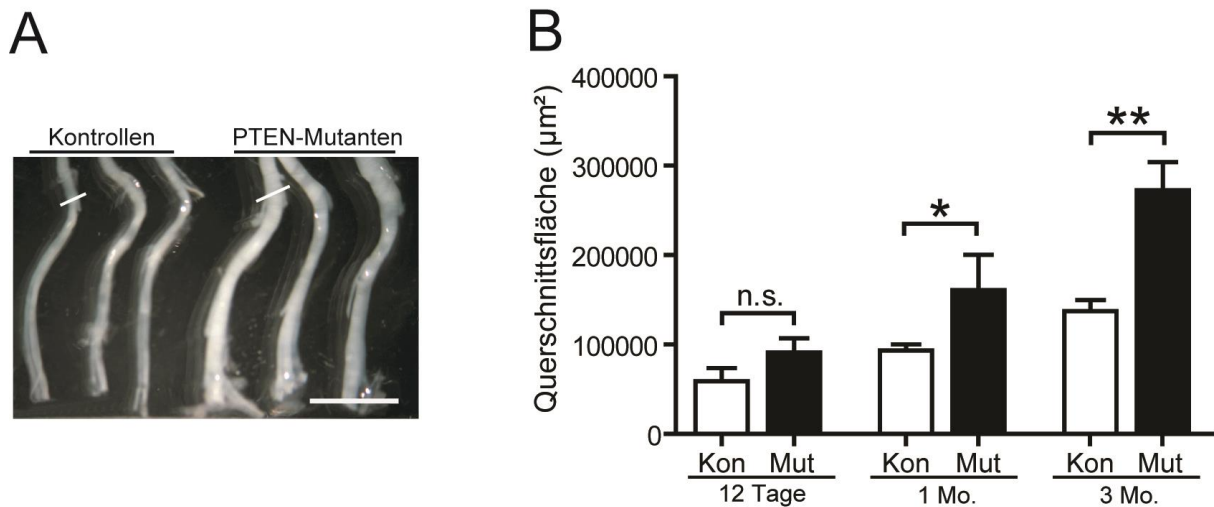


Abbildung 10: Vergrößerung des Nervus Ischiadicus der Pten-Mutanten

A Makroskopische Aufnahmen des Nervus Ischiadicus der Pten-Mutanten gegenüber gleichaltrigen Kontrollen im Alter von 3 Monaten. Die weißen Balken zeigen die Höhe der Querschnitte, die im Folgenden auf Semidünnschnitten analysiert wurden. (Messbalken: 0,5cm)

B Quantifizierung der Querschnittsflächen von Pten-Mutanten (Mut) und Kontrollen (Kon) im Alter von 12 Tagen, 1 Monat und 3 Monaten (12 Tage: $p=0,064$; 1 Monat $p^*=0,0443$; 3 Monate: $p^{**}=0,0024$; $n=3$ pro Gruppe, Fehlerbalken zeigen SEM).

3.2.2 Erhöhte Anzahl von Schwanzzellen

PTEN ist sowohl als Regulator von Zellgröße als auch von Proliferation in verschiedenen Zelltypen beschrieben (Stiles et al. 2004). Um zu erfahren, ob die in 3.2.1 beschriebene Größenzunahme der Ischiasnerven durch eine erhöhte Anzahl von PTEN-defizienten Schwanzzellen erklärt werden kann, wurden myelinisierte Axone und Schwanzzell-Kerne auf Höhe der oben-beschriebenen Querschnitte gezählt. In Semidünnschnitten von 3 Monate alten Tieren wurde sowohl die Anzahl der myelinisierten Axone pro Querschnitt (Abbildung 11A), als auch die Anzahl der Zellkerne von myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwanzzellen (SC) (Abbildung 11B) ermittelt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung von myelinisierten Axonen um 26%, sowie eine signifikante Erhöhung der Zellkerne myelinisierender SC (66%) und nicht-myelinisierender SC (28%) (myelinisierte Axone: Kontrollen $4152 \pm 277,8$, Pten-Mutanten $5234 \pm 98,15$, $p=0,0214$; myelinisierende SC: Kontrollen $167,7 \pm 8,876$, Pten-Mutanten $278,0 \pm 25,36$, $p=0,0148$; nicht-myelinisierende SC: Kontrollen $56,00 \pm 7,572$, Pten-Mutanten $127,7 \pm 16,42$, $p=0,0166$; $n=3$ für alle Gruppen).

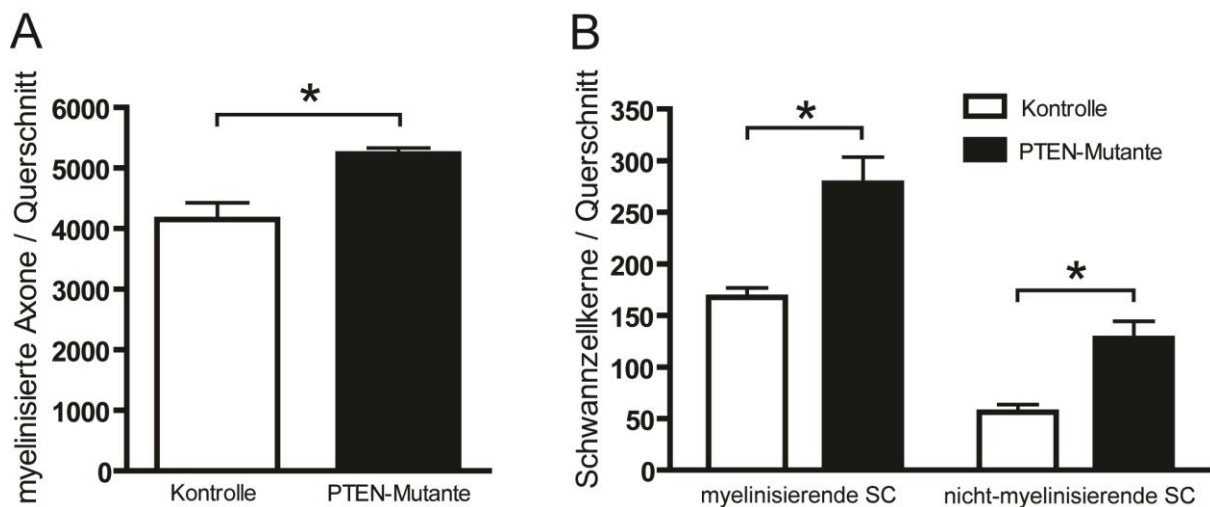


Abbildung 11: Anzahl von myelinisierten Axonen und von Schwannzellen

A Quantifizierung der myelinisierten Axone pro Gesamt-Querschnitt bei den Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 3 Monaten ($p^*=0,0214$, $n=3$ pro Gruppe).

B Quantifizierung der myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwannzellen durch Zählung der zugehörigen Zellkerne auf Querschnitten von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 3 Monaten (Myelinisierende Schwannzellen: $p^*=0,0148$; nicht-myelinisierende Schwannzellen: $p^*=0,0166$; $n=3$ pro Gruppe, Fehlerbalken zeigen SEM).

3.2.3 Ektopische Myelinisierung von kleinen Axonen

Auf Grund der in 3.2.2 beschriebenen Zunahme von myelinisierten Axonen stellte sich die Frage, welche Axone zusätzlich myelinisiert wurden. Als Schwellenwert für ein Axon um von einer Schwannzelle myelinisiert zu werden wird in der Literatur ein Durchmesser von circa $1 \mu\text{m}$ angegeben (Michailov et al. 2004; Taveggia et al. 2005). Um zu prüfen, ob in den Pten-Mutanten eine Myelinisierung von normalerweise nicht-myelinisierten Axonen stattfindet, wurde eine immunhistochemische Doppelmarkierung angewandt. Paraffinschnitte von Ischiasnerven der Pten-Mutanten und Kontrollen wurden mit Antikörpern gegen Peripherin – einem axonalen Intermediärfilament, welches in nicht-myelinisierten C-Fasern exprimiert wird (Escurat et al. 1990; Goldstein et al. 1991) – und mit Antikörpern gegen *Myelin protein zero* (P0) – ein Strukturprotein des kompakten Myelins (Martenson et al. 1971) – detektiert. Wir verzeichneten eine Vergrößerung unmyelinisierter, Peripherin-positiver Axone und eine Vergrößerung der Remak-Bündel-Bereiche zwischen den myelinisierten Axonen. Außerdem ließ sich eine große Anzahl an Axonen beobachten, die Peripherin-positiv waren und zudem von P0-positivem, kompaktem Myelin umgeben waren (Abbildung 12A). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die zusätzlich myelinisierten Axone von den PTEN-defizienten Schwannzellen vermutlich aus dem Pool der normalerweise unmyelinisierten Remak-Axone rekrutiert wurden (sog. ektopische Myelinisierung).

Zur Quantifizierung der vermuteten ektopischen Myelinisierung wurde mittels Stichproben die Häufigkeitsverteilung der myelinisierten Axone auf den Semidünnschnitten errechnet (siehe 2.2.5). Nach Aufteilung der myelinisierten Axone in verschiedene Größenklassen zeigte sich, in den Klassen $<2 \mu\text{m}$ und $2-3 \mu\text{m}$ zusammengenommen eine signifikante Erhöhung um durchschnittlich 1329 Axone, in der Klasse $>7 \mu\text{m}$ eine Erhöhung um 62 Axone (Abbildung 12B). Der bedeutende Anteil von zusätzlichen myelinisierten Axonen in den Pten-Mutanten

rekrutierte sich somit aus dem Pool der kleinen, im Normalfall nicht myelinisierten, Axone (Axondurchmesser: Kontrollen $<2\mu\text{m}$ 791.9 ± 181.7 , Pten-Mutanten 1753 ± 48.88 , $p=0,0069$; Kontrollen $2-3\mu\text{m}$ 1388 ± 49.61 , Pten-Mutanten 1765 ± 115.0 , $p=0,0395$, Kontrollen $>7\mu\text{m}$ 13.82 ± 7.374 , Pten-Mutanten 75.81 ± 13.31 , $p=0,0152$; $n=3$ für alle Gruppen).

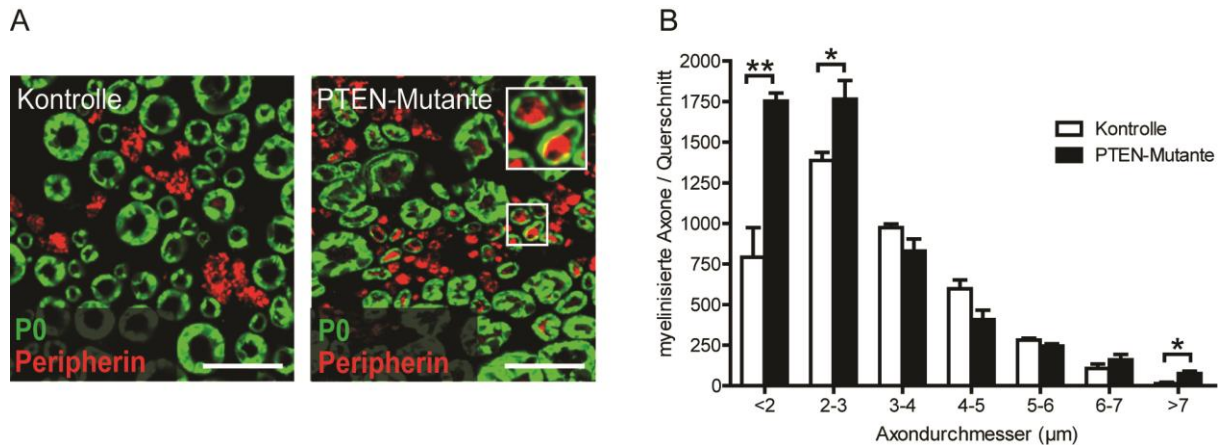


Abbildung 12: Ektopische Myelinisierung von C-Faser-Axonen in den Pten-Mutanten

A Immunhistochemische Markierung von C-Faser-Axonen durch Peripherin-Antikörper (in Rot) und der Myelinscheide durch Antikörper gegen *Myelin protein zero* (P0) (in Grün). Auffällig waren in den Pten-Mutanten Peripherin-positive Axone, die von einer Myelinscheide umgeben waren (Inset).

B Quantifizierung der myelinisierten Axone im Histogramm ($<2\mu\text{m}$: $p^{***}=0,0069$; $2-3\mu\text{m}$: $p^*=0,0395$; $>7\mu\text{m}$: $p^*=0,0152$; $n=3$ für alle Gruppen, Fehlerbalken zeigen SEM).

3.2.4 Bildung von „Remak-Myelin“

Um die in 3.2.3 beschriebene Vergrößerung der Remak-Bündel und der zugehörigen Axone näher zu untersuchen, wurden die histologischen Studien der Remak-Bündel auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen (EM-Aufnahmen) von 4 Monate alten Versuchstieren fortgesetzt. Wir beobachteten, dass die Bereiche der Remak-Bündel in den Ischiasnerven der Pten-Mutanten eine größere Fläche ausfüllten und die einzelnen Remak-Axone vergrößert waren (Abbildung 13A und B). Die statistische Auswertung der EM-Aufnahmen bestätigte eine signifikante Vergrößerung der Remak-Axon-Durchmesser in den Pten-Mutanten um durchschnittlich 21% (Abbildung 13D) (Axondurchmesser: Kontrollen $0.5564\mu\text{m} \pm 0.007469$, Pten-Mutanten $0.6756\mu\text{m} \pm 0.03667$, $p=0,0333$, $n=3$ für alle Gruppen). Die PTEN-defizienten Schwannzellen formten multiple Wicklungen von nicht-kompaktierten Zellmembranen um die Remak-Axone – im Folgenden als „Remak-Myelin“ bezeichnet (Abbildung 13C) –, die in den Kontrollen nicht beobachtet wurden. Weiterhin zeigten sich Membranfortsätze ohne axonalen Kontakt (sog. Lamellipodien).

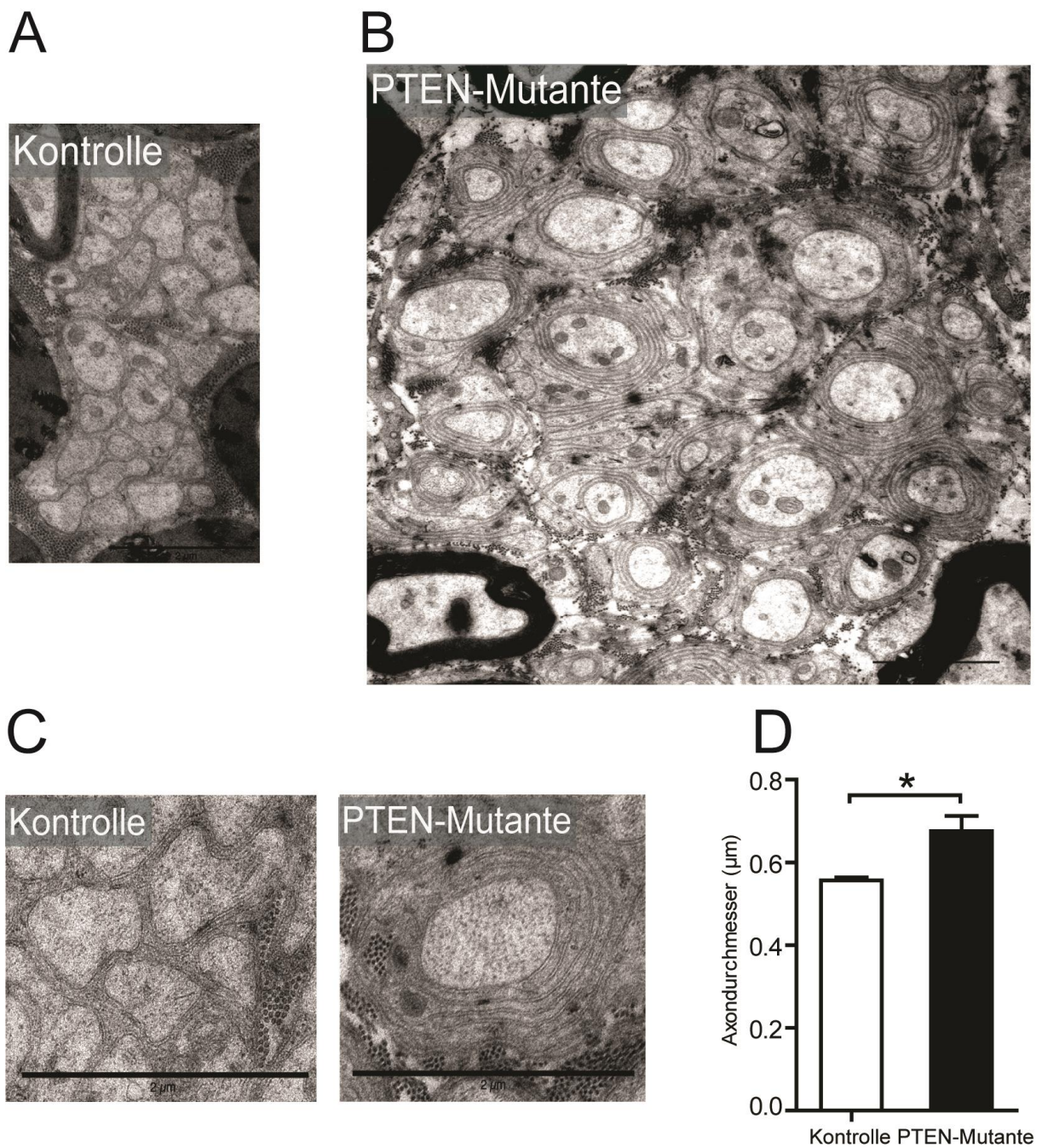


Abbildung 13: Bildung von „Remak-Myelin“ in den Pten-Mutanten und Zunahme der Axongröße unter Einfluss der PTEN-defizienten Remak-Schwannzellen

A, B EM-Übersichtsaufnahmen repräsentativer Remak-Bündel von Kontrollen und Pten-Mutanten. Sichtbar werden multiple Membranwicklungen um unmyelinisierte Axone (sog. „Remak-Myelin“) und Membranfortsätze ohne axonalen Kontakt im Fall der Pten-Mutanten. Die Aufnahmen A und B sind im gleichen Maßstab dargestellt (Messbalken: 2 μm).

C Vergrößerte Darstellung des „Remak-Myelin“ der Pten-Mutanten. Diese Strukturen waren in den Kontrollen nicht nachweisbar (Messbalken: 1 μm).

D Darstellung der durchschnittlichen Axondurchmesser in Remak-Bündeln von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 4 Monaten ($p^*=0,0333$; $n=3$ pro Gruppe, Fehlerbalken zeigen SEM).

3.2.5 Membranwicklungen um Kollagen-Fasern

Zusätzlich zu den in 3.2.4 beschriebenen Einschlüssen von Remak-Bündeln fanden sich auf EM-Aufnahmen hoher Vergrößerung (1:10000) Bündel von Kollagenfasern, die von PTEN-defizienten Schwanzzellen durch multiple Membranlamellen umwickelt wurden. Dieser Prozess, der an Frühstadien der Myelinisierung mit der Bildung unkompakten Myelins erinnert, ist in verschiedenen Stadien auf EM-Aufnahmen 4 Monate alter Pten-Mutanten dargestellt (Abbildung 14). Die beschriebenen spiralförmigen Membranumwicklungen von Kollagenfasern waren in den Kontrollen in keinem Fall sichtbar.

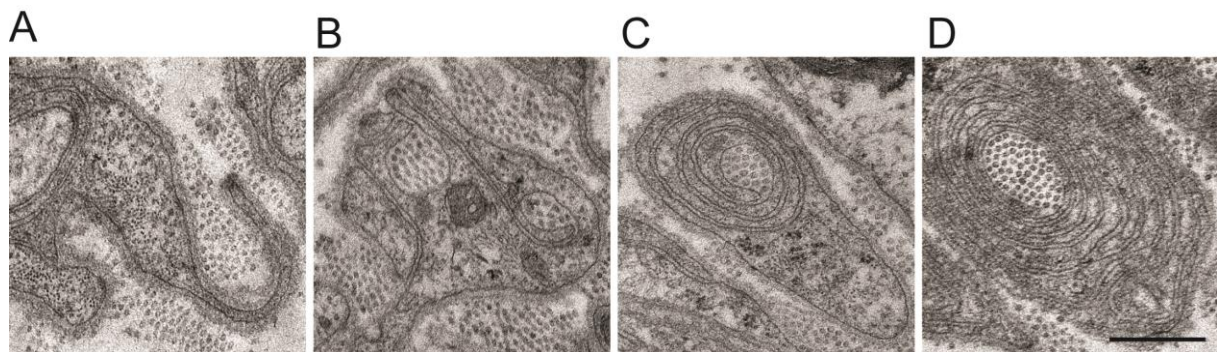


Abbildung 14: Aktive Umwicklung von Kollagenfasern durch nicht-myelinisierende Schwanzzellen
Es werden die hypothetischen verschiedenen Stufen der Bildung von Membranwicklungen um Kollagenfaserbündel durch PTEN-defiziente Schwanzzellen der Pten-Mutanten im Alter von 4 Monaten dargestellt:

- A** Die Fortsätze der Schwanzzellen wachsen aus und umfassen ein Bündel von Kollagenfasern.
 - B** Das Kollagenfaserbündel ist vollständig von Zellmembran der Schwanzzelle umschlossen.
 - C** Die Schwanzzelle beginnt zusätzliche Membranwicklungen um das Kollagenfaserbündel zu formen.
 - D** Die Anzahl an Wicklungen ist progredient.
- (Messbalken: 500 nm)

3.2.6 Hypermyelinisierung von Axonen kleiner 2 μm

Um zu untersuchen, ob der Verlust von funktionalem PTEN einen Einfluss auf die Regulation der Myelinbildung der Schwanzzellen hat, wurden auf Semidünnschnitten von Ischiasnerven 43 Tage alter Tiere bei jeweils 100 Axonen die *g-ratio* als Maß für die Myelindicke bestimmt (siehe 2.2.5). In der Messung ergab sich kein statistisch-signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen *g-ratio* (Abbildung 15B) (*g-ratio*: Kontrollen 0.6332 ± 0.01324 , $n=8$; Pten-Mutanten 0.6316 ± 0.009492 , $n=6$; $p=0,9292$). Die vermessenen Axone zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Durchmesser (Abbildung 15C) (Axondurchmesser: Kontrollen $3.709\mu\text{m} \pm 0.07496$, $n=8$, Pten-Mutanten $3.835 \pm 0.07158\mu\text{m}$, $n=6$; $p=0,258$). Auf Grund der technischen Limitierung der Lichtmikroskopie wurden nur Axone mit einem Durchmesser bis 2 μm einbezogen.

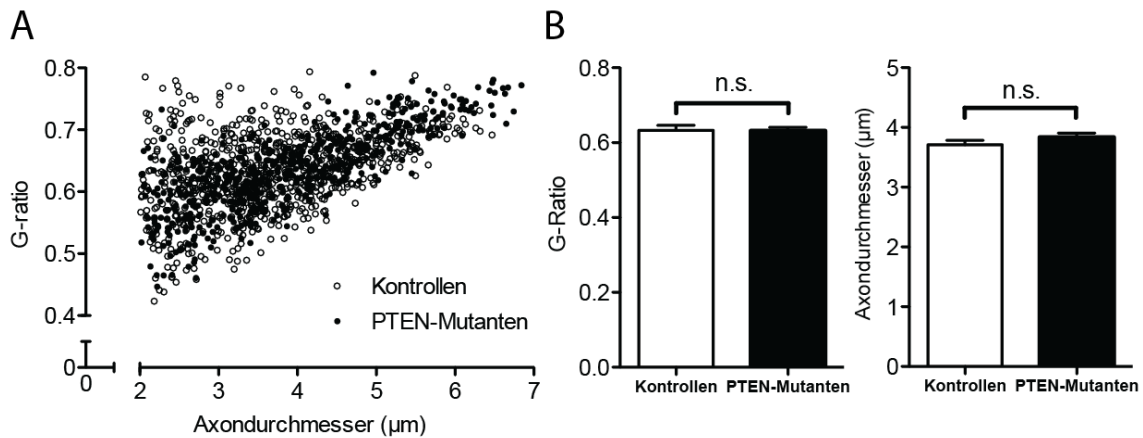


Abbildung 15: Myelindicke von Axonen mit einem Durchmesser grösser als 2 µm

A Punktdiagramm der Einzelmesswerte für die *g-ratio* zwischen von Axonen mit einem Durchmesser grösser als 2 µm Axondurchmesser von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 1,5 Monaten (n=3 pro Gruppe).

B Darstellung der durchschnittlichen *g-ratio* von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 1,5 Monaten ($p=0,9292$; n=8 in der Gruppe der Pten-Mutanten, n=6 in der Kontrollgruppe).

C Darstellung der durchschnittlichen Axondurchmesser von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 1,5 Monaten ($p=0,258$; n=8 in der Gruppe der Pten-Mutanten, n=6 in der Kontrollgruppe, Fehlerbalken zeigen SEM).

Die Vermessung von Axonen mit einem Durchmesser von kleiner als 2 µm wurde auf elektronenmikroskopischer Ebene fortgeführt. Es wurden die *g-ratios* auf EM-Aufnahmen (Vergrößerung 1:8000) 3 Monate alter Tiere ermittelt. Pro Tier wurden zwischen 69 und 118 Einzelaxone vermessen. Es ergab sich eine hochsignifikante Erhöhung der Myelindicke in den Axonen mit einem Durchmesser von weniger als 2 µm. (*g-ratio*: Kontrollen 0.6434 ± 0.002566 , Pten-Mutanten 0.5734 ± 0.009579 , $p=0,0021$, n=3 für alle Gruppen). Die Axondurchmesser zeigten keinen signifikanten Unterschied im Durchmesser, was auf vergleichbare Stichproben an Axonen zwischen Pten-Mutanten und Kontrollen hinweist (Axondurchmesser: Kontrollen 4.439 ± 0.1687 , Pten-Mutanten 4.613 ± 0.1221 , $p=0,4498$; n=3 für alle Gruppen).

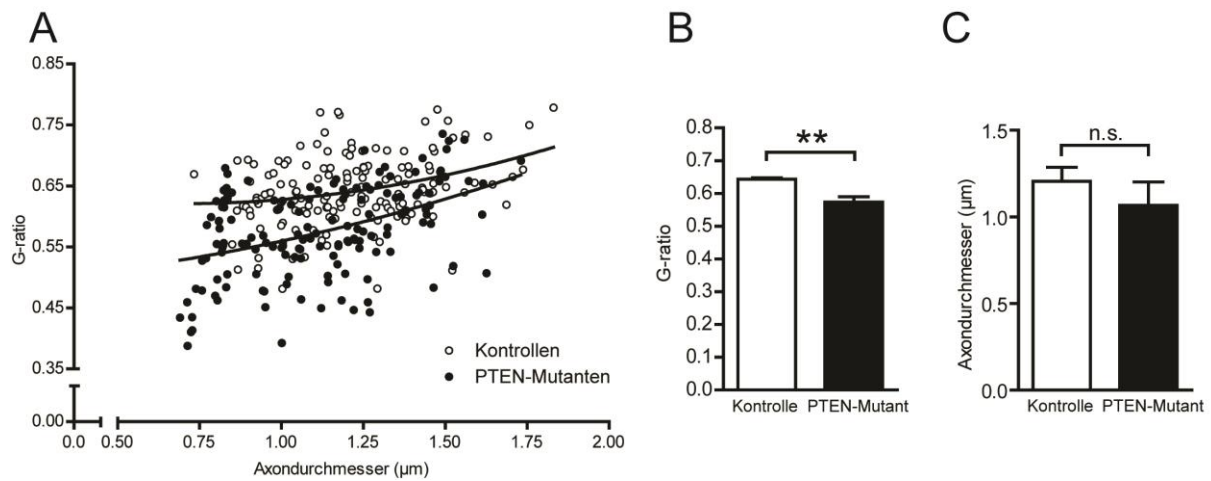


Abbildung 16: Hypermyelinisierung von Axonen mit weniger als 2 µm Durchmesser

A Punktdiagramm der Einzelmesswerte für die *g*-ratio zwischen 0,5 µm und 2 µm Axondurchmesser von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 3 Monaten (n=3 pro Gruppe).

B Darstellung der durchschnittlichen *g*-ratio von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 3 Monaten (p**=0,0021; n=3 pro Gruppe).

C Darstellung der durchschnittlichen Axondurchmesser von Pten-Mutanten und Kontrollen im Alter von 3 Monaten (p=0,45; n=3 pro Gruppe, Fehlerbalken zeigen SEM).

3.2.7 Fokale Hypermyelinisierung und kommaförmige Myelinausstülpungen bei größeren Axonen

Zusätzlich zu der regulären Hypermyelinisierung von kleinen Axonen (siehe 3.2.6) zeigten sich – vor allem in größeren Axonen – fokale Hypermyelinisierungen (Tomacula) und kommaförmige Myelinausstülpungen (Kommata). Histologisch fielen Ähnlichkeiten zu den auch beim Menschen beschriebenen Tomaculopathien auf (Madrid und Bradley 1975). Die Bildung dieser Myelinabnormitäten in der Entwicklung der Pten-Mutanten ist in Abbildung 17A auf Semidünnschnitten im Alter von 12 Tagen bis 3 Monaten gezeigt. Die Tiere der Kontrollgruppen zeigten in allen Altersstadien ein Vorkommen von unter 0,5% bezüglich dieser Auffälligkeiten (Abbildung 17A, rechts unten). Eine Quantifizierung ergab einen deutlichen Anstieg dieser Strukturen im Alter von 12 Tagen (12d) bis 1 Monat (1 Mo.). Im Alter von 1 bis 3 Monaten war kein weiterer Anstieg von Myelinabnormitäten messbar (Abbildung 17B) (Tomacula: 12d 1.892 ± 0.1310 , 1 Mo. 6.354 ± 0.3705 , 3 Mo. 6.550 ± 0.07264 ; Kommata: 12d 0.2389 ± 0.06521 , 1 Mo. 2.569 ± 0.4646 , 3 Mo. 2.759 ± 0.2452 ; n=3 für alle Gruppen). Die Myelinabnormitäten wurden mit zunehmendem Alter komplexer; es konnten beispielsweise mehr Auswüchse und Wicklungen innerhalb eines Tomaculums beobachtet werden.

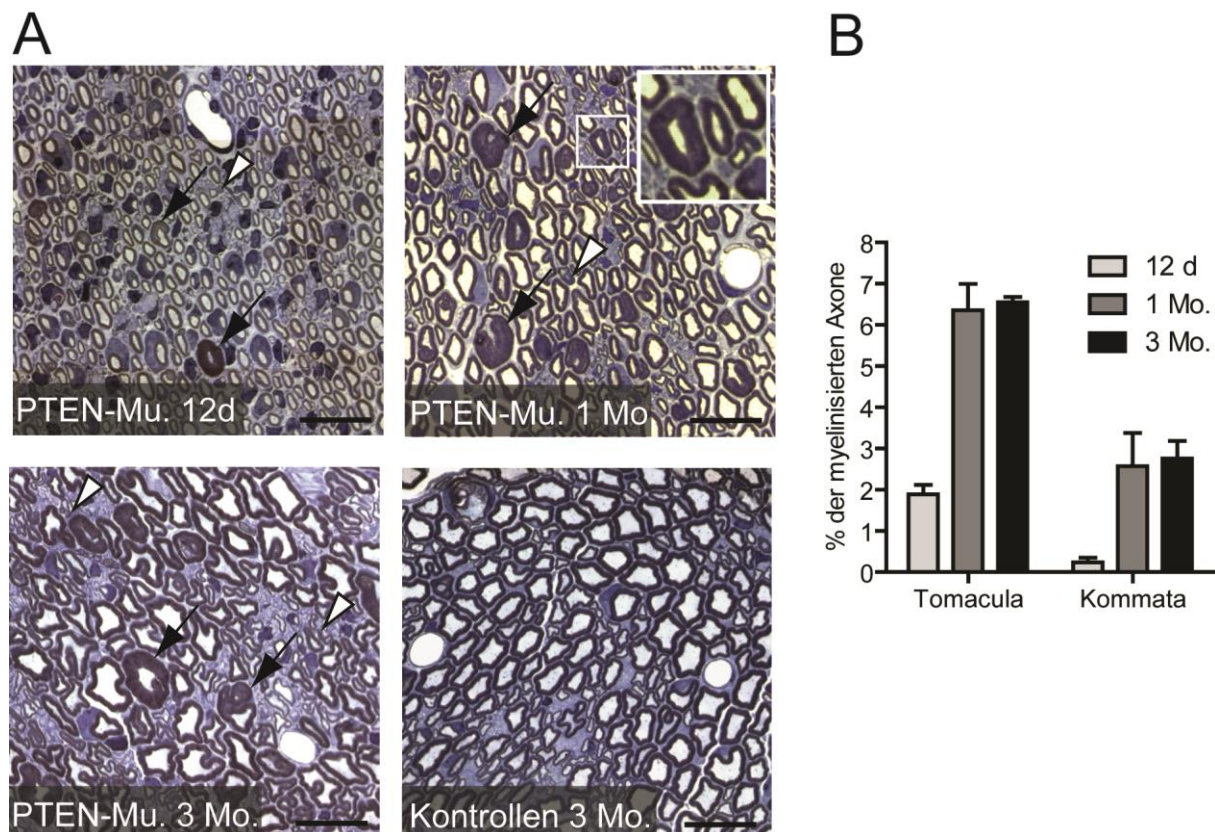


Abbildung 17: Fokale Hypermyelinisierung (Tomacula) und kommaförmige Myelinausstülpungen (Kommata) in den Pten-Mutanten

A Auf Semidünnschnitten von Pten-Mutanten im Alter von 12 Tagen (12d), 1 Monat (1 Mo.) und 3 Monaten (3 Mo.) sind fokale Hypermyelinisierungen (Pfeile) und kommaförmige Myelinausstülpungen (Kommata) (Pfeilspitzen) sichtbar. Das Inset zeigt ein Tomaculum und eine kommaförmige Myelinausstülpung. (Messbalken: 20 μ m)

B Statistische Auswertung der Anzahl der Tomacula und der Kommata auf Semidünnschnitten im Alter zwischen 12 Tagen (12 d) und 1 Monat (1 Mo.) (n=3 für alle Gruppen, Fehlerbalken zeigen SEM).

Zur genaueren Beschreibung der verschiedenen Formen von Myelinabnormitäten wurden EM-Aufnahmen angefertigt. Neben den typischen Tomacula (Abbildung 18C,D) und Kommata (Abbildung 18A,B) ließen sich weiterhin Myelinschleifen (Abbildung 18E) beobachten, die sich sowohl an der abaxonalen Seite der Myelinmembran (*recurrent loops*) als auch adaxonal bildeten (*invaginating recurrent loops*) und eine der ursprünglichen Myelinmembran identische Dicke aufwiesen. Morphologisch schienen die einwärts gerichteten adaxonalen Schleifen gelegentlich das jeweilige Axon einzuengen (Abbildung 18F).

Möglicherweise stellen die verschiedenen Formen in Abbildung 18 verschiedene Stadien in der Entwicklung der Tomacula dar. Tomacula würden sich demnach durch ein weiteres Wachstum der Kommata mit Rückfaltung des Auswuchses in Richtung des Axons über Zwischenformen (Abbildung 18B) bilden.

Die Ultrastruktur des Myelins – wie der Abstand zwischen *major dense line* und *intraparallel line* – und deren Morphologie blieb dabei auf EM-Aufnahmen unverändert zu den Kontrollen (Abbildung 18G). Vereinzelt ließ sich eine axonale Degeneration beobachten, bei der das geschädigte Axon inklusive seiner Myelinscheide durch Makrophagen abgebaut wurde (Abbildung 18H). Die axonale Degeneration war aber nicht vorherrschend in den Pten-Mutanten, da sie – wie in 3.2.2 beschrieben – eher eine erhöhte Anzahl an myelinisierten Axonen

zeigten als einen Verlust myelinisierter Axone. Zudem konnten auf den Aufnahmen der Ischias-Nerven keine weiteren Zeichen axonaler Degeneration (Zwiebelschalenmuster oder Hypomyelinisierungen) gefunden werden.

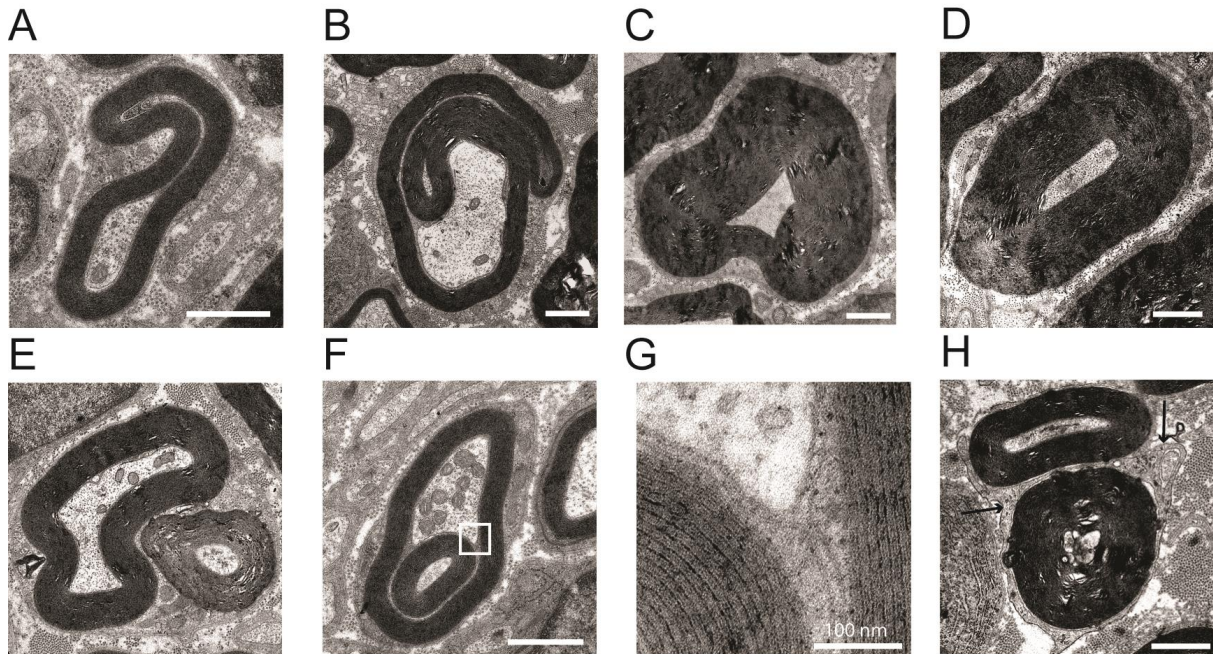


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Charakterisierung der verschiedenen Formen des aberranten Myelins der Pten-Mutanten.

A EM-Aufnahme einer typischen kommaförmigen Myelinausstülpung (Komma).

B Eine fokale Hypermyelinisierung, die möglicherweise eine Zwischenform von einem Komma zu einem Tomaculum darstellt.

C Eine typische fokale Hypermyelinisierung (Tomaculum), die in dieser Form am häufigsten in den Pten-Mutanten gefunden wird.

D Eine regelmäßige Hypermyelinisierung.

E Eine schlauchförmige Myelinschleife, die vermutlich in einer anderen Bildebene Anschluss an die Myelinscheide findet (sog. *recurrent loop*).

F Eine Myelineinfaltung, die möglicherweise das Axon einengt (sog. *invaginating recurrent loop*). Die Dicke der *recurrent loops* ist mit der ursprünglichen Myelinscheide identisch.

G Eine Vergrößerung des Inset aus **F**, die zeigt, dass die Ultrastruktur des Myelins in den Pten-Mutanten unverändert ist. (Messbalken: 100 nm)

H Ein durch überschüssige Myelinbildung geschädigtes Axon wird von einem Makrophagen abgebaut. Sichtbar sind die einschließenden Fortsätze des Makrophagen (Pfeile).

(Messbalken für A-F und H: 1 µm)

3.2.8 Lokalisation der Tomacula anliegend an Regionen unkompakten Myelins

Nach der Beschreibung und Quantifizierung der fokalen Hypermyelinisierungen in 3.2.7 stellt sich die Frage nach deren Lokalisation innerhalb der Internodien. Um die Axone mit Myelinscheide longitudinal darzustellen, wurden sogenannte „*teased fiber*-Präparationen“ von Ischias-Nerven der Versuchstiere angefertigt (siehe 2.2.4.8). Mit dieser Technik lassen sich die

Tomacula in ihrer longitudinalen Ausbreitung darstellen. Tomacula zeigen sich üblicherweise als runde Verdickungen im Verlauf der einzelnen Nervenfasern.

Die Tomacula in den „*teased fiber*-Präparationen“ der Pten-Mutanten traten nicht gleichmäßig verteilt über die Länge der Internodien auf sondern bevorzugt an Regionen des unkompakten Myelins, den Paranodien (Abbildung 19A) und den Schmidt-Lantermann-Inzisuren (SLI) (Abbildung 19B) auf (Poliak und Peles 2003).

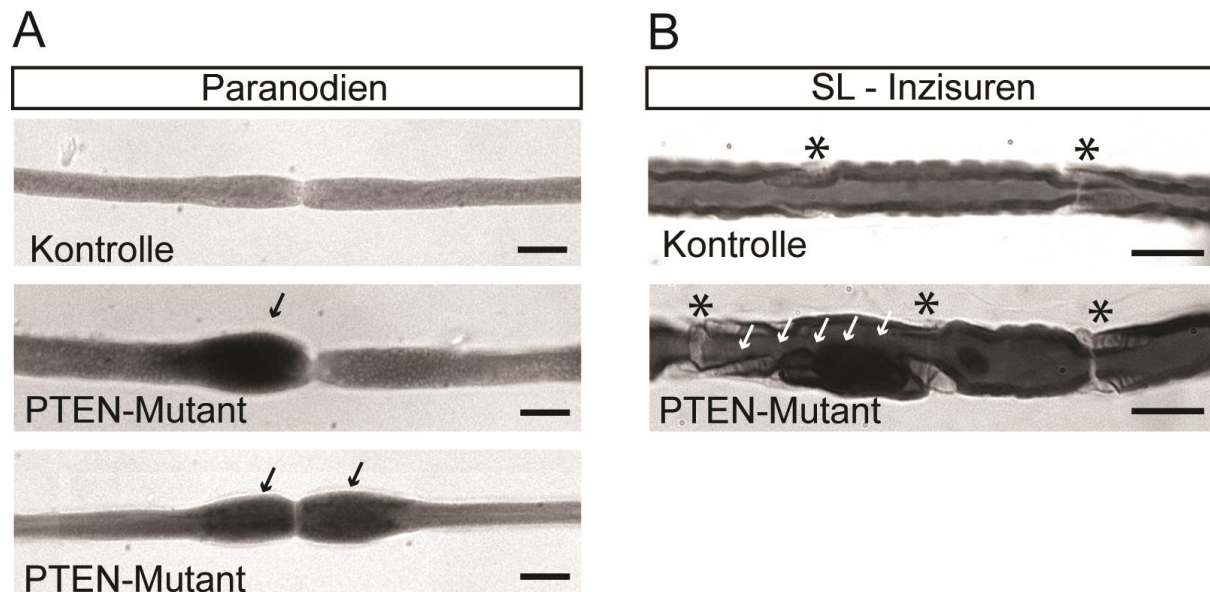


Abbildung 19: Lokalisation der Tomacula der Pten-Mutanten an Paranodien und Schmidt-Lantermann-Inzisuren

A In der Längsansicht der „*teased fiber*-Präparationen“ fanden sich die Tomacula (Pfeile) anliegend an die Paranodien sowohl unilateral (Mitte) als auch bilateral (unten).

B Schmidt-Lantermann-Inzisuren (SL-Inzisuren) (Sterne) stellten einen weiteren Ort dar, an dem fokale Myelinverdickungen bevorzugt auftraten (Pfeile).

(Messbalken: 10 μm)

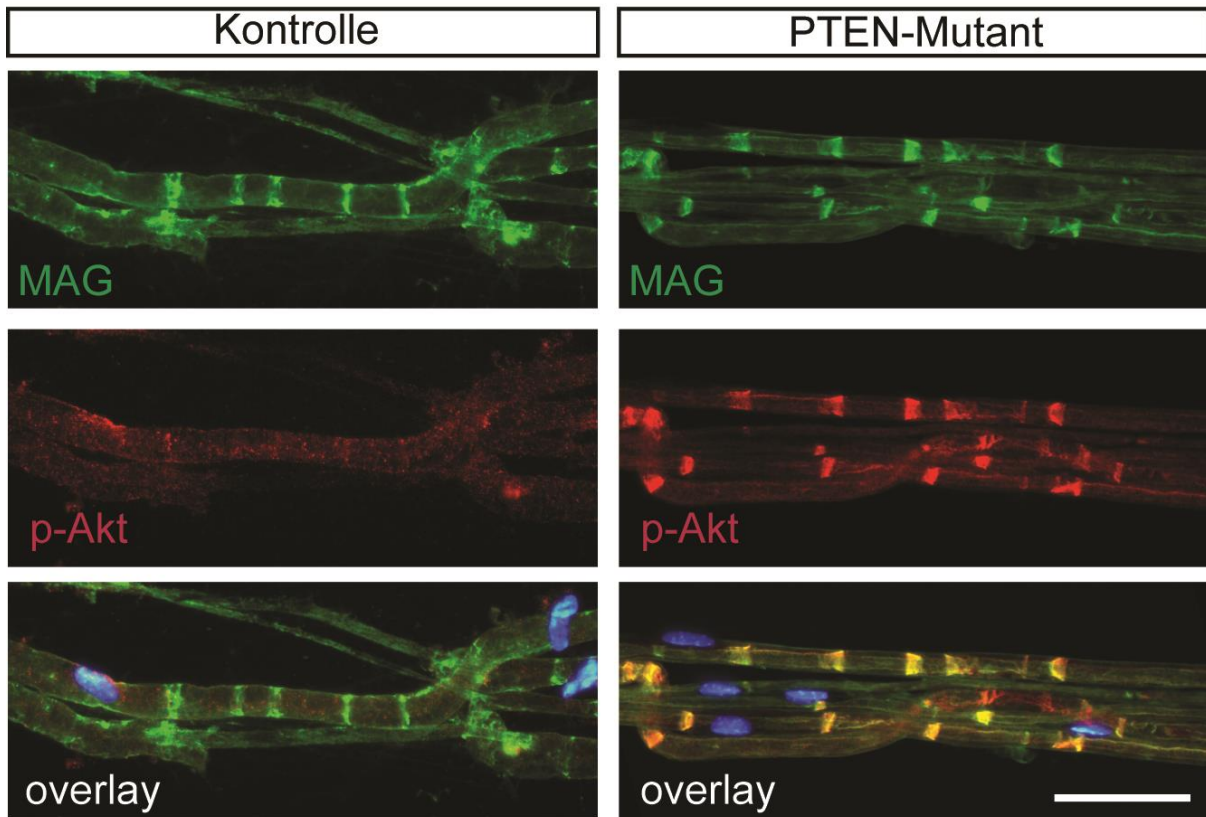
3.2.9 Anreicherung von phosphoryliertem AKT im unkompakten Myelin und in nicht-myelinisierenden Schwannzellen

Da die Tomacula in der Längsansicht vornehmlich anliegend an den Regionen des unkompakten Myelins auftraten, untersuchten wir im Folgenden, ob in diesen Regionen der PTEN-Verlust zu einer veränderten Aktivität des PI3K-AKT-Signalwegs führt.

PIP₃, der von der PI3K produzierte membrangebundene *second messenger*, rekrutiert die Proteinkinase AKT über ihre PH-Domäne an die Zellmembran (Cantley 2002), was zu ihrer Aktivierung durch Phosphorylierung führt. Um die lokale Aktivität des PI3K-AKT Signalwegs darzustellen, wurde eine immunhistochemische Detektion mit Antikörpern gegen phosphoryliertes AKT (p-AKT) auf „*teased fiber*-Präparationen“ und auf Querschnitten von Ischias-Präparaten durchgeführt. Als Marker für unkompaktes Myelin dienten Antikörper gegen *Myelin-associated Glycoprotein* (MAG) (Quarles 1983). Als Marker für kompaktes Myelin wurden Antikörper gegen *Myelin protein zero* (P0) verwendet (Trapp et al. 1981). Auf diese Weise

konnten wir in den *Pten*-Mutanten eine deutliche Anreicherung von p-AKT in Paranodien und SLI darstellen (Abbildung 20A). Auf den Querschnitten markierte p-AKT die SLI in der typischen Form von konzentrischen Ringen in der Myelinscheide (Abbildung 20B).

A



B

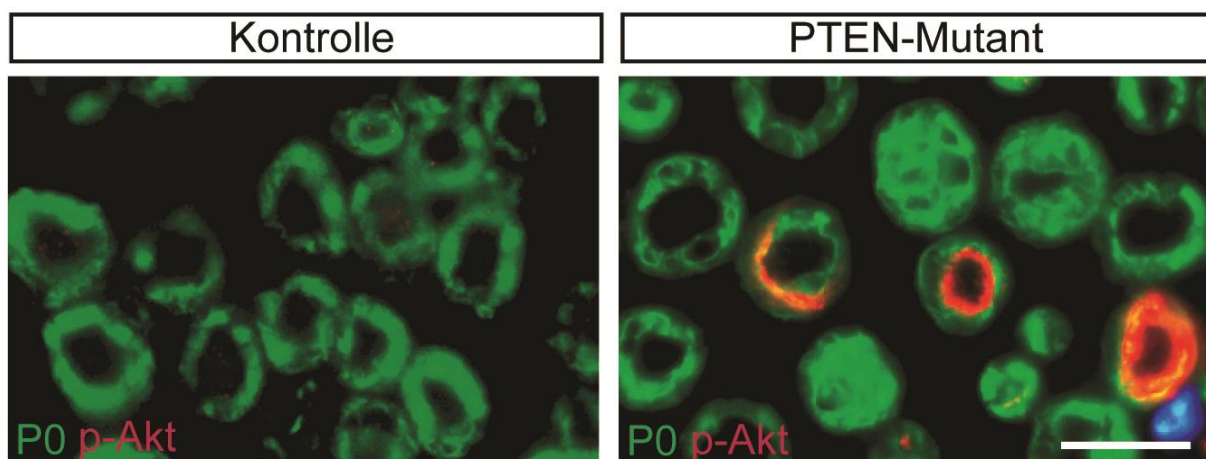


Abbildung 20: Markierung von phosphoryliertem AKT in Regionen unkompakten Myelins

A Immunhistochemische Analyse von *teased fibers* mit Antikörpern gegen *Myelin-associated glycoprotein* (MAG) (in grün) und mit Antikörpern gegen phosphoryliertes AKT (p-AKT) (in rot).

B Immunhistochemische Analyse von Querschnitten des Nervus Ischiadicus mit Antikörpern gegen *Myelin protein zero* (P0) (in grün) und mit Antikörpern gegen p-AKT (in rot). (Messbalken: 50µm)

Weiterhin gingen wir der Frage nach, ob es in den nicht-myelinisierenden Schwannzellen der Pten-Mutanten (siehe 3.2.4) durch PTEN-Verlust ebenfalls zu einer Anreicherung von p-AKT kommt. Querschnitte von Ischiasnerven wurden mit Antikörpern gegen p-AKT und P0 markiert. Es zeigte sich in den Pten-Mutanten ein deutlich stärkeres Signal sowie eine zirkuläre Anreicherung von p-Akt in den Regionen der Remak-Bündel (Abbildung 21). Diese zirkulären p-AKT Muster entsprechen möglicherweise den Bereichen des Schwannzell-Zytoplasmas, in denen eine aktive Bildung von „Remak-Myelin“ um kleine Axone stattfindet.

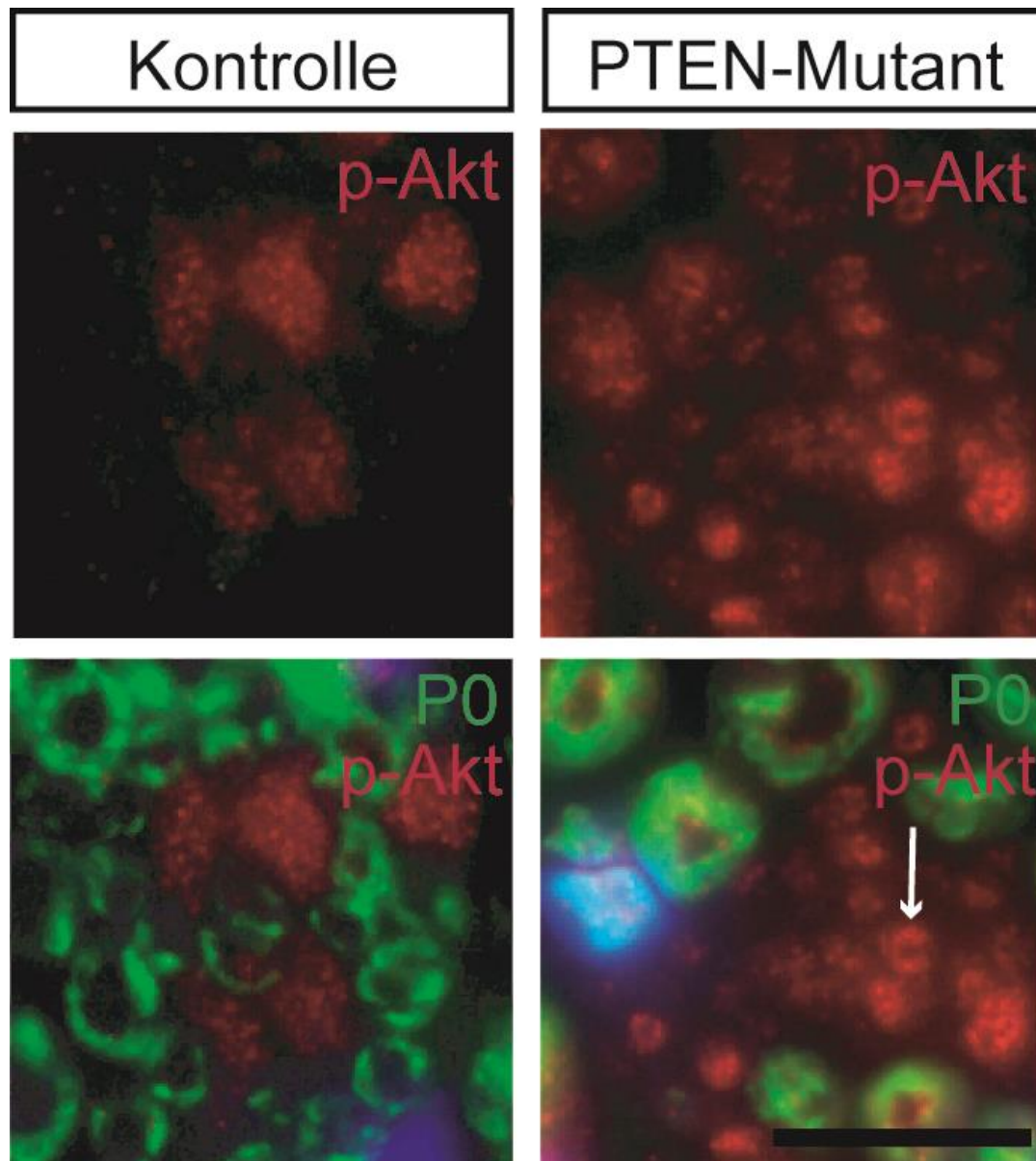


Abbildung 21: Markierung von phosphoryliertem AKT in nicht-myelinisierenden Schwannzellen

Die immunhistochemische Analyse von Querschnitten des Nervus Ischiadicus mit Antikörpern gegen phosphoryliertes AKT (p-AKT) (in rot) und *Myelin protein zero* (P0) (in grün) zeigt eine zirkuläre Anreicherung von p-AKT in den Remak-Bündeln der Pten-Mutanten (Pfeil). Umgeben sind diese Regionen von Axonen mit Myelinscheide (in grün). (Messbalken: 20 μm)

3.2.10 Unveränderte Verteilung von DLG1 und PAR3 im Myelin der Pten-Mutanten

Die direkte Interaktion von PTEN mit *mammalian disks large homolog 1-protein* (DLG1) – einem Bestandteil des unkompakten Myelins – ist eine Voraussetzung zur Bildung einer intakten Myelinscheide im PNS (Cotter et al. 2010). Wir untersuchten daher, ob in den Pten-Mutanten eine veränderte Lokalisation von DLG1 vorliegt. Wir konnten jedoch mittels Immunhistochemie bei den Pten-Mutanten weder einen Unterschied in der Verteilung noch in der Stärke des Dlg1-Signals dokumentieren (Abbildung 22A).

Weiterhin untersuchten wir die Verteilung des Gerüstproteins *partitioning defective protein-3* (PAR3) in der Myelinscheide der Pten-Mutanten. Für PAR3 konnte bereits eine wichtige Rolle in der Polarisierung der Schwannzelle und Regulation der Myelinisierung nachgewiesen werden (Chan et al. 2006). Zudem wurde bereits eine direkte Interaktion von PAR3 mit PTEN beschrieben (Feng et al. 2008). Eine abweichende Verteilung von PAR3 in den Schwannzellen der Pten-Mutanten konnten wir mittels Immunhistochemie jedoch ebenfalls nicht verzeichnen (Abbildung 22B).

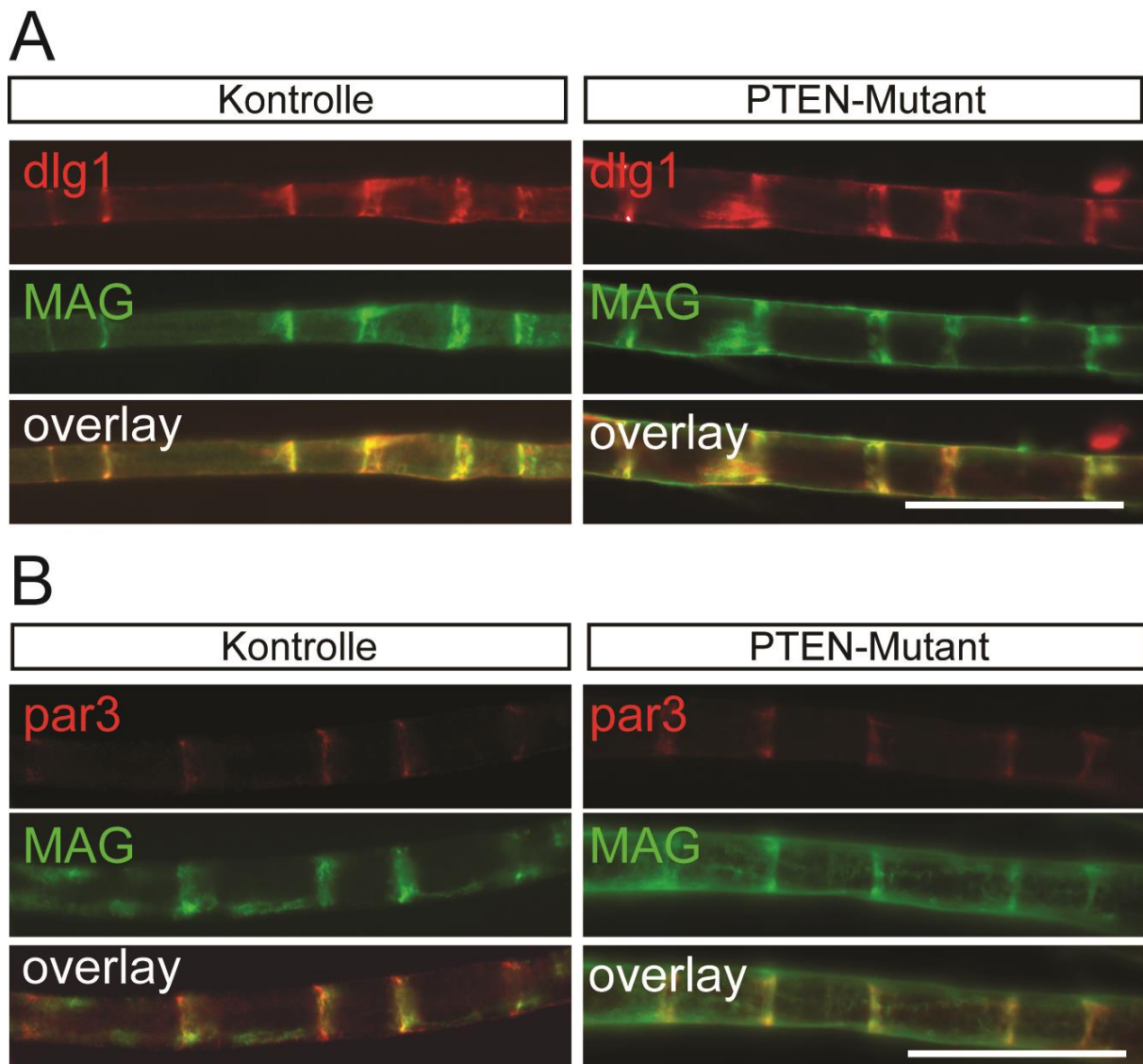


Abbildung 22: Unveränderte Verteilung von DLG1 und PAR3 in Regionen unkompakten Myelins

A Immunhistochemische Analyse von „teased fiber-Präparationen“ mit Antikörpern gegen *Mammalian disks large homolog 1-protein* (Dlg1) (in rot) und *Myelin-associated glycoprotein* (MAG) zur Markierung des unkompakten Myelins (in grün).

B Immunhistochemische Analyse von „teased fiber-Präparationen“ mit Antikörpern gegen *Partitioning defective protein-3* (PAR3) (in rot) und MAG (in grün) zur Markierung des unkompakten Myelins. (Messbalken: 50 µm)

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die angestrebte konditionale Inaktivierung des *Pten*-Gens in den Schwanzzellen der Versuchstiere erreicht werden konnte. Durch eine PCR auf genomischer DNA des Nervus Ischiadicus der *Pten*-Mutanten wurde die gewebespezifische Exzision von Exon 5 des *Pten*-Gens nachgewiesen. Weiterhin wurde mittels Western-Blot-Analyse aus Protein-Lysaten des Nervus Ischiadicus sowohl eine Verminderung des intakten PTEN-Proteins als auch eine Erhöhung von p-AKT und p-S6-Protein in den *Pten*-Mutanten detektiert.

Somit konnten wir nachweisen, dass in den Ischias-Nerven der *Pten*-Mutanten durch den Verlust von PTEN eine verstärkte Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs – mitsamt seinen Mediatorproteinen p-AKT und p-S6 – erreicht wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Auswirkung des PTEN-Verlusts und der Überaktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs in Schwanzzellen auf den histologischen Phänotyp der *Pten*-Mutanten untersucht.

Es zeigte sich eine Vergrößerung der Ischias-Nerven durch eine erhöhte Anzahl von Schwanzzellen und myelinisierten Axonen.

In myelinisierten Axonen mit einem Durchmesser bis 2 μm zeigte sich bevorzugt eine gleichmäßige Vergrößerung der Myelinscheiden (Hypermyelinisierung). In größeren Axonen wurden mehr fokale Hypermyelinisierungen (Tomacula), kommaförmige Myelinausstülpungen (Kommas), sowie Myelinschleifen gefunden, die sich abaxonal (Recurrent loops) und adaxonal (Invaginating recurrent loops) bildeten. Die Tomacula wiesen histologische Gemeinsamkeiten mit der beim Menschen beschriebenen *Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies* (HNPP) auf. Die Kommas glichen vorbeschriebenen Veränderungen im Mausmodell der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 4B1 (CMT4B1). Ursprungsort der fokalen Hypermyelinisierungen sind vermutlich die Regionen unkompakten Myelins (Paranodien und Schmidt-Lantermann-Inzisuren).

Zusätzlich bildeten PTEN-defiziente Schwanzzellen multiple Membranwicklungen um normalerweise unmyelinisierte C-Faser-Axone der Remak-Bündel („Remak-Myelin“) und um Bündel von Kollagenfibrillen.

Eine verstärkte lokale Aktivität des PI3K-AKT-Signalwegs in Form einer Anreicherung von p-AKT sowohl in Regionen unkompakten Myelins als auch in den nicht-myelinisierenden Schwanzzellen der *Pten*-Mutanten konnte gezeigt werden.

4 Diskussion

Axonal präsentierte Neuregulin1 Typ III (NRG1III) als Agonist an ErbB2/3-Rezeptoren der Schwannzelle wurde als ein notwendiger Faktor für sämtliche Entwicklungsstufen der Schwannzelle identifiziert. Insbesondere gilt seine Konzentration auf der axonalen Membran als Regulator sowohl für das *radial sorting* als auch für die Dicke der Myelinscheide nach abgeschlossener Myelinisierung (Nave und Salzer 2006).

Die Frage, welche intrazellulären Signalwege in der Schwannzelle diese Funktionen steuern, ist bisher noch nicht abschließend beantwortet. Der PI3K-AKT-Signalweg wurde sowohl mit Polarisierungsprozessen und gerichtetem Membranwachstum als auch mit der Regulation von Differenzierung und Zellwachstum in Verbindung gebracht. Weiterhin wurde die Notwendigkeit des PI3K-AKT-Signalwegs für die Differenzierung und Myelinisierung in Schwannzellen bereits beschrieben (Maurel und Salzer 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in einem Mausmodell die Funktion des PI3K-AKT-Signalwegs *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Mausmutanten generiert, die mittels einer konditionalen Inaktivierung der PIP3-Phosphatase PTEN in Schwannzellen und Oligodendrozyten ein Überangebot von PIP3 und somit eine Überaktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs aufweisen (Pten-Mutanten). Sollte die Signalachse über PI3K-PIP3-AKT ein zentraler Vermittler des NRG1III-Signals *in vivo* sein, so müsste es zu einem Phänotyp kommen, der deutliche Veränderungen in verschiedenen Entwicklungsstufen der Schwannzelle aufweisen würde. Insbesondere müsste es zu einer Zunahme der Dicke der Myelinscheide (Hypermyelinisierung) und einer Beeinflussung des *radial sorting* kommen, so die Arbeitshypothese.

In der Tat ergab die histologische Analyse des Nervus Ischiadicus der Pten-Mutanten eine regelmäßige Hypermyelinisierung von Axonen bis zu einem Durchmesser von 2 μm . Größere Axone zeigten hauptsächlich fokale Hypermyelinisierungen (Tomacula), die vermutlich in Regionen ihren Ursprung hatten, in denen eine erhöhte AKT-Aktivität sichtbar gemacht werden konnte.

Weiterhin konnten wir eine erhöhte Anzahl von myelinisierten Axonen kleineren Durchmessers verzeichnen. Diese ektopische Myelinisierung erfolgte vermutlich aus dem Pool der normalerweise unmyelinisierten Remak-Axone im Sinne eines verstärkten *radial sorting*.

Zudem entwickelten auch die nicht-myelinisierenden Schwannzellen einen drastischen Phänotyp. Sie formten inkomplettes Myelin („Remak-Myelin“) um Axone der Remak-Bündel und um Kollagenfasern. Auch in diesen Regionen war eine deutliche Zunahme von aktiviertem AKT nachweisbar.

Im Folgenden sollen diese Ergebnisse im Detail diskutiert werden.

4.1 Vorüberlegungen zur Verwendung des Mausmodells

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten $Cnp1^{Cre/WT*Pten^{lox/lox}}$ -Mutanten (Pten-Mutanten) weisen eine konditionale Inaktivierung des Pten-Gens in Schwanzzellen und Oligodendrozyten auf. Unter der Kontrolle des Cnp1-Promotors, der in Schwanzzellen und Oligodendrozyten aktiv ist, schneidet die Cre-Rekombinase das durch loxP-Erkennungssequenzen flankierte Exon5 des Pten-Gens heraus. Die Expression von intaktem PTEN wird auf diesem Weg spezifisch in Schwanzzellen und Oligodendrozyten verhindert. Der Nachweis Cre-spezifischer Deletion in den Pten-Mutanten konnte auf DNA-Ebene mittels PCR erbracht werden (Abbildung 7). Als Resultat zeigte sich eine Reduktion von PTEN-Protein im Nervus Ischiadicus um mehr als 40 Prozent (Abbildung 8). Die verbliebene Menge an intaktem PTEN lässt sich durch Neurone und Bindegewebe mit unverändertem Pten-Gen erklären.

Die Expression von Cnp1 beginnt bereits pränatal in der Embryonalentwicklung der Schwanzzellen (Edwards und Braun 1988). Um den Einfluss von PTEN im adulten Tier zu erforschen, verglichen wir in Folgeexperimenten die Pten-Mutanten mit Mausmutanten, in denen eine Inaktivierung von Pten erst postnatal durch Gabe von Tamoxifen induziert wurde (Goebbels et al. 2012). Diese adulten Mäuse entwickelten ebenfalls einen Phänotyp mit Tomacula und Myelinausfaltungen. Wir schließen daraus, dass der Phänotyp der Pten-Mutanten nicht lediglich auf eine gestörte Embryonalentwicklung durch eine frühe CNP-Cre-Expression zurückgeführt werden kann. Die Analyse der Pten-Mutanten erlaubt daher generelle Rückschlüsse auf die über die gesamte Lebensspanne erhaltene Funktion von PTEN und dem PI3K-AKT-Signalweg in Schwanzzellen.

Als Kontrollen dienten in sämtlichen Untersuchungen $Cnp1^{WT/WT*Pten^{lox/lox}}$ -Mutanten (Kontrollen), die zwar homozygote loxP-Insertionen besitzen aber keine Cre-Rekombinase exprimieren. Die Wahl der Kontrollen sicherte eine größtmögliche genetische Homologie zu den Pten-Mutanten, da sie als Geschwistertiere aus den gleichen Verpaarungen hervorgingen, phänotypisch aber unauffällig waren. Ein intrinsischer Einfluss der loxP-Sequenzen auf den flankierten Abschnitt – ohne die Aktivität der Cre-Rekombinase – ist trotz Gebrauchs bei einer Vielzahl von Mausmutanten mit loxP-Insertionen in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

4.2 Regulation der Myelinisierung

4.2.1 *Der PI3K-AKT-Signalweg als Vermittler der Axongröße*

Die Dicke der Myelinscheide steht in einem konstanten Verhältnis zum Axondurchmesser (Donaldson und Hoke 1905). Die Information über die Größe des Axons und respektive die Dicke der Myelinscheide wird durch die Konzentration von axonalem NRG1III über ErbB2/3-Rezeptoren an die Schwannzelle übermittelt (siehe 1.1.3.1). Transgene Mausmutanten, die NRG1III in Axonen überexprimieren (NRG1III-Überexprimierer), entwickeln daher im PNS eine regelmäßige Hypermyelinisierung (Michailov et al. 2004). Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Signalstärke des PI3K-Signals in Schwannzellen von der Konzentration an axonal-präsentiertem NRG1III abhängt (Taveggia et al. 2005) (siehe 1.1.3.2.). In den Pten-Mutanten als *in vivo* Modell einer Überaktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs konnten wir bei Axonen mit einem Durchmesser bis 2 μm eine regelmäßige Hypermyelinisierung nachweisen, die histologisch mit denen der NRG1III-Überexprimierer vergleichbar ist (Abbildung 16). Auf Basis dieser Daten konnte somit – erstmals *in vivo* – eine Beteiligung des PI3K-AKT-Signalwegs an der Regulation der Myelindicke im PNS gezeigt werden (Goebbels et al. 2010). Möglicherweise leitet innerhalb der Schwannzelle die PI3K-AKT-Signalstärke als Vermittler der axonalen NRG1III-Konzentration die Information über die Axongröße über noch unklare Mechanismen weiter. Die Verstärkung des PI3K-AKT-Signals durch PTEN-Verlust würde in diesem Modell zu einer Überschätzung der Axongröße durch die Schwannzellen führen und in der beobachteten Hypermyelinisierung resultieren.

Ein weiterer Signalweg, der ebenfalls durch NRG1-ErbB2/3-Bindung in der Schwannzelle aktiviert wird, ist der *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg mit seinen Effektorkinasen ERK1/2. Seine Aktivierung ist abhängig von der Tyrosinphosphatase SHP2 (Grossmann et al. 2009). In den Pten-Mutanten fanden wir keine Hinweise auf eine geänderte Aktivität des MAPK-Signalweg (Goebbels et al. 2012). Transgene Mausmutanten mit Expression einer konstitutiv-aktiven Form der MAPK1 in Schwannzellen und Oligodendrozyten entwickelten hingegen ebenfalls eine Hypermyelinisierung (Ishii et al. 2013). Eine konditionale Inaktivierung der NRG1-Rezeptorkomponente ErbB3 oder der Phosphatase SHP2 führte zu deutlichen Myelinisierungsdefekten. Diese Defekte konnten in Mausmutanten durch Expression einer konstitutiv-aktiven MAPK1 teilweise ausgeglichen werden. Daraus wurde geschlossen, dass ein MAPK1-Signal – auch ohne ein NRG1III-Signal – auszureichen scheint, um eine Myelinisierung in Schwannzellen zu initiieren (Sheean et al. 2014). Festzustellen ist aber auch, dass ohne ein NRG1-Signal ein physiologisches Verhältnis von Axongröße zu Myelindicke in diesen Mausmutanten nicht erreicht wurde. Vielmehr entwickelten sie mit zunehmendem Alter eine Neuropathie durch anhaltendes Myelinwachstum (Sheean et al. 2014). Vermutlich macht erst die richtige Balance zwischen MAPK- und PI3K-Signalweg eine unbeeinträchtigte Myelinisierung möglich. Zukünftige Experimente, die diese Balance schrittweise verschieben, wären notwendig. Beispielsweise könnte eine Kreuzung von NRG1III-Überexprimierern mit gesteigerten PI3K-Signal und Mausmutanten, die eine induzierbare MAPK-Aktivität besitzen, weiteren Aufschluss über die beteiligten Signalwege geben.

4.2.2 Entstehung von fokalem Myelinwachstum

Die Aktivierung der PI3-Kinase durch Bindung von NRG1III am ErbB2/3-Rezeptor führt zur Synthese von membrangebundenem Phosphatidyl-(3,4,5)-Trisphosphat (PIP3) aus Phosphatidyl-(4,5,-)Bisphosphat (PIP2). Durch die lokale Anreicherung von PIP3 findet in diesem Bereich der Zellmembran eine Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Effektorproteinen des Signalwegs statt. Am besten charakterisiert ist die Proteinkinase AKT, die durch Phosphorylierung aktiviert wird und weitere Effektoren steuert (siehe 1.1.3.2.). Als Resultat des Verlustes von PTEN in Schwannzellen konnten wir in Ischiasnerven sowohl eine Erhöhung von PIP3 gegenüber PIP2 als auch mehr phosphoryliertes AKT (p-AKT) nachweisen (Goebbels et al. 2010) (Abbildung 9A). Der Vergleich mit anderen Mausmodellen lässt vermuten, dass die Regulation der Lokalisation von PIP3 und AKT durch PTEN eine wichtige Rolle in der Myelinisierung spielt. Beispielsweise führte die Expression einer konstitutiv-aktiven PI3-Kinase in Schwannzellen lediglich zu einer inhibierten Myelinbildung, obwohl ebenfalls eine Erhöhung von p-AKT gemessen wurde (Sheean et al. 2014). Vermutlich war die Menge an PIP3 in diesem Fall nicht nur lokal sondern ubiquitär erhöht. Die Expression von konstitutiv-aktivem AKT1 hingegen führte zwar zu einer Hypermyelinisierung im ZNS, jedoch nicht im PNS (Flores et al. 2008). Die Autoren argumentierten, dass möglicherweise die Expression des AKT1-Transgens im PNS dort zu schwach für einen Effekt war. Eine weitere Erklärung wäre, dass – im Gegensatz zu den Pten-Mutanten – im Mausmodell von Flores et al. die Menge und Lokalisation von PIP3 unbeeinflusst war.

Im Fall der Pten-Mutanten konnten wir eine lokal-gesteigerte Aktivität des PI3K-AKT-Signalwegs in Regionen unkompakten Myelins, den Paranodien und Schmidt-Lantermann-Inzisuren (SLI) visualisieren (Abbildung 20). Wir vermuten, dass PTEN besonders in diesen Regionen als Antagonist des PI3K-Signalwegs gebraucht wird, um die Menge an PIP3 zu regulieren. Als morphologisches Korrelat einer pathologischen Anreicherung von PIP3 interpretieren wir das beobachtete fokale Myelinwachstum (Tomacula) an den Regionen des unkompakten Myelins der Pten-Mutanten (Abbildung 19).

Es ist bekannt, dass PTEN über seine PDZ-Bindungsdomäne mit Komponenten des unkompakten Myelins interagiert und dort wichtige Funktionen erfüllt. Beispielsweise ist die direkte Interaktion von PTEN mit DLG1, einem Bestandteil des unkompakten Myelins, notwendig, um in Schwannzellen die Bildung von pathologischen Myelinausfaltungen und Demyelinisierung zu verhindern (Cotter et al. 2010). Weiterhin kann das Polaritätsprotein PAR3, dessen adaxonale Lokalisation eine notwendige Voraussetzung für die Myelinisierung darstellt, ebenfalls mit PTEN interagieren (Chan et al. 2006; Feng et al. 2008). Andererseits sahen wir im Rahmen dieser Arbeit, dass ein Verlust von PTEN *in vivo* weder einen Einfluss auf die Menge noch auf die Lokalisation von DLG1 oder PAR3 im unkompakten Myelin zu haben scheint (Abbildung 22). Ein denkbarer Mechanismus wäre daher, dass PTEN – nach seiner Rekrutierung in die Regionen unkompakten Myelins durch Bindung an Polaritätsproteine wie DLG1 und PAR3 – zur physiologischen Regulation der lokalen PIP3-Menge beiträgt. Für Oligodendrozyten konnte bereits gezeigt werden, dass PIP3 die Bildung von Transportkanälen im kompakten Myelin steuert und dass diese Transportkanäle ein radiales und longitudinales Myelinwachstum im ZNS ermöglichen (Snaidero et al. 2014). Auch im PNS übernehmen Paranodien und SLI die Aufgabe von Kanälen, in denen Transport und Addition von neuen Membranbestandteilen stattfindet. Die Endo- und Exozytose wird dabei durch das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Membran-Phospholipiden gesteuert (Bolis et al. 2009). Im Fall der

Pten-Mutanten könnte der Verlust der Lipidphosphatase PTEN somit zu einer gestörten lokalen Homöostase von PIP3, PIP2 und anderen Phospholipiden führen. Als Resultat eines unkontrollierten Einbaus von Membranbestandteilen interpretieren wir die von uns beobachteten Tomacula und die kommaförmigen Membranausfaltungen (Abbildung 18).

Mit zunehmender Axongröße waren Tomacula und kommaförmige Membranausfaltungen die vorherrschende Pathologie in den Pten-Mutanten. Die in Abschnitt 4.2.1 diskutierte reguläre Hypermyelinisierung war in Axonen über 2 µm Durchmesser seltener zu beobachten und statistisch nicht mehr signifikant (Abbildung 15 und Abbildung 16). Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass in kleineren Axonen ein fokales Myelinwachstum auf Grund einer unphysiologischen lokalen Anreicherung von PIP3 durch andere PIP3-Phosphatasen wie SHIP1 und SHIP2 teilweise kompensiert wird (Xie et al. 2013). SHIP2 ist ebenfalls ein Bindungspartner von DLG1 (Awad et al. 2013). Mit zunehmender Axongröße und respektive zunehmender Myelindicke nimmt die Länge der Paranodien und SLI zu, so dass dann eine Kompensation durch die Menge an SHIP2 möglicherweise nicht mehr ausreicht. Eine denkbare Folge wäre dann die von uns beobachtete Bildung von Tomacula, besonders bei größeren Axonen.

4.2.3 Zunahme der Tomacula durch anhaltende Aktivität von mTOR

Das unkontrollierte Myelinwachstum der Pten-Mutanten setzt eine anhaltend hohe Aktivität der zellulären Maschinerie zur Produktion von Proteinen und Lipiden voraus. Diese wird unter anderem von der Proteinkinase *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), einem bekannten Ziel des PI3K-AKT-Signalwegs, gesteuert. Die Proteinkinase mTOR agiert dabei über den Proteinkomplex *mTOR-Complex 1* (mTORC1), durch den sie sowohl Proteine des translationalen Apparates als auch der Transkription und des *RNA-processing* aktiviert. Weiterhin findet über den *mTOR-Complex 2* (mTORC2) unter anderem eine negative Regulierung von AKT im Sinne einer Feedback-Schleife statt (Norrmen und Suter 2013).

Die Relevanz von mTOR in der Myelinisierung konnte bereits *in vivo* gezeigt werden. In einer Mausmutante mit konditionaler mTOR-Null-Mutation in Schwannzellen kam es zu einem gestörtem radialem und longitudinalem Myelinwachstum mit deutlicher Hypomyelinisierung (Sherman et al. 2012). In den Ischiasnerven der Pten-Mutanten haben wir hingegen eine erhöhte Aktivität von mTORC1 über die Detektion von phosphoryliertem ribosomalem Protein S6 (p-S6), einem Ziel des mTORC1, nachweisen können (Abbildung 9)(Goebbels et al. 2010; Goebbels et al. 2012). Wir schließen daraus, dass eine unphysiologisch hohe Aktivität des mTORC1 in den Pten-Mutanten an der Entstehung der Tomacula beteiligt ist, indem sie die Produktion eines Überangebots an Membran- und Myelinbestandteilen fördert. Diese Annahme konnten wir durch Folgeexperimente unserer Arbeitsgruppe weiter untermauern, indem wir die Pten-Mutanten durch die systemische Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin ab der dritten postnatalen Woche behandelten. Die nachweisbare mTOR-Inhibition durch Rapamycin führte zu einer deutlichen Abnahme sämtlicher Tomacula-Formen und Myelinausfaltungen innerhalb eines Monats. Dabei hatte die Gabe von Rapamycin keinen Einfluss auf die Myelinisierung in Wildtyp-Kontrollen (Goebbels et al. 2012).

Aus diesen Überlegungen ergibt sich ein Modell für die Entstehung der Tomacula durch PTEN-Verlust in Schwannzellen in zwei Schritten: Erstens führt eine Dysregulation der Homöostase von PIP3 im unkompakten Myelin zu einer Störung des gerichteten Einbaus von

Membranbestandteilen mit gesteigerten Membranwachstum (siehe 4.2.2). Zweitens sorgt die pathologisch-gesteigerte Synthese von neuen Membranbestandteilen durch Aktivierung von mTOR für ein Überangebot am Ort des gestörten Einbaus, so dass es zu einem anhaltenden fokalen Membranwachstum in Form der Tomacula kommt (Abbildung 18).

4.2.4 Polarisierungsstörung der PTEN-defizienten Schwannzellen

Der Prozess der Myelinisierung erfordert eine Polarisierung der Schwannzelle, in der ein zielgerichteter Transport von Membranbestandteilen zu einer Ausbildung von spezialisierten Domänen der Schwannzelle führt. Die charakteristische Protein- und Lipidkomposition dieser Domänen weist offensichtliche Ähnlichkeiten mit Epithelzellen auf (Pereira et al. 2012). Die baso-laterale Domäne der Epithelzelle entspricht dabei der abaxonalen Domäne der Schwannzelle mit der dortigen Lokalisation von PI3-Kinase, PIP3 und einer Basalmembran. Die apikale Domäne der Epithelzelle entspricht dabei dem adaxonalen Kompartiment zusammen mit Paranodien und SLI (sog. incisuro-adaxonale Domäne), die vermehrt PTEN, PIP2 und PAR3 enthält (Goebbels et al. 2012; Simons et al. 2012). Bemerkenswert ist, dass im Fall von Epithelzellen eine artifizielle Polarisierungsstörung durch ektope Insertion von PIP3 in der apikalen Domäne in dieser Region zu einem Einbau von Bestandteilen der basolateralen Domäne führte. Weiterhin kam es zu apikaler Aktinpolymerisierung und Membranprotrusionen (Gassama-Diagne et al. 2006). Der PNS-Phänotyp der Pten-Mutanten könnte als Polarisierungsstörung der Schwannzelle verstanden werden (Goebbels et al. 2012). Eine ektope Anreicherung von PIP3 in Paranodien und SLI stört den zielgerichteten Transport und führt zu einem ektopen Einbau von Membranbestandteilen und Proteinen des kompakten Myelins. Ein anhaltendes Überangebot des zellulären Syntheseapparates durch zusätzliche Überaktivierung von mTOR fördert dabei das pathologische fokale Myelinwachstum der Tomacula (siehe 4.2.3). Im Zuge dieser Betrachtung wird deutlich, dass die Interpretation des Phänotyps der Pten-Mutanten nicht nur auf eine Verstärkung PI3K-AKT-Signalwegs als Regulator von Differenzierung und Zellwachstum reduziert werden kann. Die PI3-Kinase ist durch PIP3, neben der Regulation von AKT und seinen Effektorproteinen wie mTOR, eben auch an zellulären Prozessen, wie Zellpolarität, Motilität und gerichtetem Membranwachstum beteiligt. Die hier beschriebene Analogie von Schwannzellen und Epithelzellen könnte somit bei der Identifizierung neuer Faktoren für die Myelinisierung helfen. Beispielsweise ist bereits bekannt, dass PIP3 mit Rho-GTPasen wie Rac1 und CDC42, sowie den Rac-Effektorproteinen WAVE und WASP interagiert und somit zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts in der Entwicklung von Epithelzellen beiträgt (siehe 1.1.3.2). Die Notwendigkeit des Aktin-Zytoskeletts, sowie der Rho-GTPasen und Rac-Effektoren für die Myelinisierung in Schwannzellen ist bereits beschrieben worden (Feltri et al. 2008; Fernandez-Valle et al. 1997; Novak et al. 2011).

4.3 Radial sorting und ektopische Myelinisierung

Axone mit einem Durchmesser über 1 μm werden in der Entwicklung von Schwannzellen separiert und postnatal myelinisiert. Die kleineren Axone werden von nicht-myelinisierenden Schwannzellen in sogenannte Remak-Bündel zusammengefasst. Der Prozess der Separierung wird als *radial sorting* bezeichnet (Martin und Webster 1973) (siehe 1.1.1.4). Ein Schwellenwert

der Konzentration von axonal-präsentiertem NRG1III als Maß für den Axondurchmesser wurde bereits als Auslöser dieses Prozesses in der Schwannzelle identifiziert (Nave und Salzer 2006; Taveggia et al. 2005).

In den Ischiasnerven der Pten-Mutanten konnte eine erhöhte Anzahl an myelinisierten Axonen nachgewiesen werden (Abbildung 11A). Diese zusätzlichen Axone verteilten sich hauptsächlich auf die Gruppen der kleinsten myelinisierten Axone (Abbildung 12B). Viele dieser Axone waren trotz Myelinscheide positiv für Peripherin, einem Marker für normalerweise unmyelinisierte Axone (sog. C-Faser Axone) (Goldstein et al. 1991) (Abbildung 12A). Wir schließen daraus, dass die zusätzlichen myelinisierten Axone aus dem Pool der Remak-Bündel-Axone stammen, von wo sie durch die PTEN-defizienten Schwannzellen in unphysiologisch-hoher Rate herausortiert und myelinisiert wurden. Ein Vorgang den wir als ektopische Myelinisierung bezeichnet haben (Goebbels et al. 2010).

Die ektopische Myelinisierung in den Pten-Mutanten wies erstmals *in vivo* auf das PI3K-AKT-Signal als Mediator des NRG1III-Schwellenwert und „Trigger“ im Rahmen des *radial sorting* hin (Goebbels et al. 2010). Die unphysiologische Verstärkung des PI3K-AKT-Signalwegs durch Verlust seines Antagonisten PTEN in Schwannzellen führt in unserem Modell zu einer Herabsetzung dieses NRG1-Schwellenwertes. Als Resultat dieses Vorgangs interpretieren wir die von uns beobachtete ektopische Myelinisierung im PNS der Pten-Mutanten.

In diesem Zusammenhang ist weiterhin bemerkenswert, dass in Ratten über eine ektopische Myelinisierung berichtet wurde, die nach intraperitonealer Injektion von *glial cell line-derived neurotrophic Factor* (GDNF) auftrat (Hoke et al. 2003). Eine Erklärung dafür wäre, dass von Schwannzellen sezerniertes GDNF seinerseits die axonale Expression von NRG1 stimuliert (Chen et al. 2003). Diese regulatorische Feed-back-Beziehung zwischen Axon und Schwannzelle wäre in den Pten-Mutanten möglicherweise beeinflusst. Eine durch PTEN-Verlust erhöhte Sensitivität für neuronale Wachstumsfaktoren wie NRG1 könnte bei Schwannzellen zur Proliferation sowie zu einer verstärkten Sekretion von Neurotrophinen wie NGF und GDNF führen. Die Axone würden auf die Neurotrophine mit einer Vergrößerung und der Expression von Faktoren reagieren, welche das *radial sorting* stimulieren und eine Myelinisierung fördern könnten. Dazu würde unsere Beobachtung passen, dass wir in den Ischiasnerven der Pten-Mutanten – neben der ektopen Myelinisierung, sowohl eine erhöhte Anzahl von Schwannzellen (Abbildung 11B), als auch und einen vergrößerten Durchmesser von myelinisierten (Abbildung 12B) und unmyelinisierten Axonen (Abbildung 13D) gemessen haben.

4.4 Inkomplettes Myelin um Remak-Axone (Remak-Myelin)

In den Pten-Mutanten sahen wir multiple Membranwicklungen um normalerweise unmyelinisierte „C-Faser Axone“ (Abbildung 13). Eine derartige pathologische Morphologie war in der Literatur nicht vorbeschrieben und wurde von uns als „Remak-Myelin“ bezeichnet (Goebbels et al. 2010). Wir vermuten, dass das „Remak-Myelin“ durch eine Anreicherung von PIP3 nach Kontakt mit den C-Faser-Axonen in den nicht-myelinisierenden Schwannzellen entsteht. Die detektierte ringförmige Verteilung von p-AKT (Abbildung 21) interpretieren wir dabei als Indikator für die Lokalisation von PIP3 in der Zelle, da p-AKT erst bei Bindung an PIP3 entsteht. Wir vermuten, dass in den mutanten Gliazellen durch die Anreicherung von PIP3 die Bildung von Remak-Myelin als ein autonom-ablaufender Prozess initiiert wird. Diese Bildung scheint nämlich nicht abhängig von spezifischen bidirektionalen Signalen zwischen Axon und

Schwanzzelle zu sein, da wir auch um Kollagenfaserbündel die Bildung von „Remak-Myelin“ beobachten konnten (Abbildung 14). Denkbar wäre in diesem Fall, dass die Bindung der Kollagenfasern an Integrin-Rezeptoren der mutanten Schwanzzellen ebenfalls eine Anreicherung von PIP3 bewirkt. Es ist bereits bekannt, dass Integrine über die Proteinkinase *focal adhesion kinase* (FAK) den PI3K-AKT-Signalweg aktivieren können (Zhang und Hochwald 2014). Die FAK spielt für Schwanzzellen eine wichtige Rolle, da die konditionale Inaktivierung von FAK in Schwanzzellen sowohl zu Defekten bei der Myelinisierung als auch im *radial sorting* führte (Grove et al. 2007).

Die Myelinisierung ist normalerweise abhängig von spezifischen axonalen Signalen. In Zellkultur werden beispielsweise von Oligodendrozyten ausschließlich Axone myelinisiert, jedoch niemals die Dendriten (Lubetzki et al. 1993). Im Fall des „Remak-Myelin“ konnten wir eine beginnende Kompaktierung nur in Einzelfällen beobachten. Wir vermuten daher, dass die zur Kompaktierung notwendige Expression von Proteinen des kompakten Myelins wie P0 und PMP22 von zusätzlichen Signalwegen abhängt, die weder von C-Faser-Axonon noch von Kollagenfasern aktiviert werden (Goebbels et al. 2010).

Mittlerweile sind weitere von NRG1 abhängige Signalwege in der Schwanzzelle identifiziert worden. Zu ihnen zählen neben dem PI3K-AKT-mTOR-Signalweg und FAK-Signalweg auch der MAP-Kinase- und PLC γ -assoziierte Signalwege. Sämtliche Signalwege wurden sowohl mit Veränderung der Genexpression als auch mit zytoplasmatischen Prozessen wie Zellpolarisierung in Verbindung gebracht (Newbern und Birchmeier 2010). Die konditionale Inaktivierung verschiedener Faktoren in Schwanzzellen führte bisher häufig zu einer eher unspezifischen Inhibierung der Myelinisierung (Novak et al. 2011; Sherman et al. 2012; Thurnherr et al. 2006). Die hier beschriebene gesteigerte Aktivierung der PTEN-abhängigen Signalwege resultierte jedoch in einer zuvor unbekanntem Myelinmorphologie (Remak-Myelin) und könnte somit neue Rückschlüsse auf die Funktion der betroffenen Signalwege ermöglichen.

4.5 Die Pten-Mutanten als Neuropathie-Modell

Der Phänotyp der Pten-Mutanten erlaubt verschiedene Schlussfolgerungen im Hinblick auf die Entwicklungsbiologie der Schwanzzelle und die bei der Myelinisierung beteiligten Signalwege (siehe 4.2). Im Folgenden sollen ergänzend die Ähnlichkeiten der Pten-Mutanten mit den vorbeschriebenen Mausmodellen verschiedener Neuropathien des Menschen diskutiert werden. Die Verwertbarkeit der Pten-Mutanten für bestehende Modelle der Pathogenese von Neuropathien mit Dysmyelinisierung sowie ihr Potential in Bezug auf die Erforschung möglicher Therapieansätze steht dabei im Mittelpunkt der folgenden Betrachtung.

Einleitend soll betont werden, dass der Phänotyp der Pten-Mutanten nicht als Hinweis auf Pten als Zielgen von hereditären Neuropathien verstanden werden sollte. Mausmutanten mit kompletter Deletion von Pten in allen Zelltypen sind nicht lebensfähig (Di Cristofano et al. 1998). Heterozygote Keimbahnmutationen mit Funktionsverlust von Pten sind vorbeschrieben und führen zu Ausbildung von Syndromen mit Hamartombildung und erhöhtem Malignomrisiko (siehe 1.2.3). Periphere Neuropathien sind nicht als typische Merkmale der Pten-assoziierten Syndrome beschreiben.

Die Pten-Mutanten zeigen in Form der Tomacula und Myelinausfaltungen histologische Merkmale bestimmter demyelinisierender Neuropathien des Menschen. In Folgeexperimenten konnten wir zusätzlich auch typische elektrophysiologische Merkmale von demyelinisierenden Neuropathien wie reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten und reduzierte Summenaktionspotentiale in den Versuchstieren nachweisen (Goebbels et al. 2012). Zu diesen Neuropathien zählen zum einen bestimmte Unterformen der hereditären *Charcot-Marie-Tooth disease* (CMT), sowie die *Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies* (HNPP), für die ursächliche Genmutationen bereits identifiziert werden konnten (siehe 1.3).

Somit sollte der direkte Vergleich der Pten-Mutanten mit bereits beschriebenen Mausmodellen für Neuropathien, die ähnliche histologische Auffälligkeiten zeigen, wichtige Hinweise zum Verständnis der Pathomechanismen wie auch zu möglichen Therapieansätzen geben.

4.5.1 Gestörte Phosphoinositid-Homöostase bei der Entwicklung von Myelinausfaltungen

Der Vergleich der Pten-Mutanten mit Mausmodellen für Unterformen der CMT4 lässt als gemeinsamen Pathomechanismus eine gestörte Phosphoinositid-Homöostase vermuten. Die ursächlichen Genmutationen der CMT4B1 (Mtmr2-Gen), der CMT4B2 (Mtmr13-Gen) und der CMT4H (Frabin-Gen) betreffen Proteine, die durch ihre *FYVE zinc finger domain* und *Pleckstrin homology domains* diese Phosphoinositide binden können (Goebbels et al. 2012; Suter 2007). Die konditionale Inaktivierung der Lipidphosphatase *Myotubularin related protein-2* (MTMR2) im Mausmodell der CMT4B1 führt ebenfalls zu kommaförmigen Myelinausfaltungen, jedoch nicht zu Tomacula oder der Bildung von „Remak-Myelin“ um C-Fasern (Bolis et al. 2005). Die Autoren vermuten, dass MTMR2 durch seine Eigenschaft als PI(3)P- und PI(3,4)P-Phosphatase den intrazellulären Vesikeltransfer zur Plasmamembran steuert und somit das lokale Membranwachstum reguliert (Bolis et al. 2009). Bemerkenswert ist, dass der Verlust von MTMR2 zu einer verringerten Konzentration von DLG1 im unkompakten Myelin der CMT4B1-Mutanten führt (Bolis et al. 2005). Hier ergibt sich ein deutlicher Zusammenhang zu den Pten-Mutanten, denn es ist vorbeschrieben, dass die Lokalisation von PTEN im unkompakten Myelin des PNS von dessen direkter Interaktion mit DLG1 abhängt (Cotter et al. 2010). Somit wäre denkbar, dass es auch im unkompakten Myelin des CMT4B1-Mausmodells zu einem funktionalen Verlust von PTEN kommt. Dieser Verlust stellt möglicherweise eine gemeinsame Endstrecke im Pathomechanismus der Dysmyelinisierung von Pten-Mutanten und der CMT4B1 dar. Die 3'-Phosphoinositid-Phosphatasen PTEN und MTMR2 würden in diesem Modell, trotz unterschiedlicher Substrate, bei Verlust zu einer möglicherweise synergistischen Störung der lokalen Phosphoinositid-Homöostase führen (Di Paolo und De Camilli 2006).

Diese morphologischen und funktionalen Gemeinsamkeiten beider Mausmodelle könnten Hinweise auf zukünftige Therapieansätze bieten. Im Falle der Pten-Mutanten konnten wir in Folgeexperimenten durch systemische Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin die Anzahl der Myelinausfaltungen und Tomacula signifikant reduzieren (Goebbels et al. 2012). Somit wäre das Prinzip einer pharmakologischen mTOR-Inhibition möglicherweise auch ein Therapieansatz im Fall der CMT4B1. Passend zu diesen Überlegungen konnte eine Veränderung des PI3K-AKT-mTor-Signalwegs im Mausmodell der CMT4B1 und CMT4B2 bereits gezeigt werden (Berger et al. 2011). Auch wenn eine systemische Gabe des starken Immunsuppressivums Rapamycin der Transplantationsmedizin und Onkologie vorbehalten bleibt, wäre in der Behandlung der

CMT4B1 eine lokale transdermale Applikation denkbar, gegebenenfalls zur Behandlung von neuropathischen Scherzen (Goebbels et al. 2012; Rauktys et al. 2008).

4.5.2 Vergleich mit tomaculösen Neuropathien

Hinsichtlich der Tomacula weisen die Pten-Mäuse deutliche histologische Ähnlichkeiten mit bereits beschriebenen Mausmodellen für tomaculöse Neuropathien auf. Den klassischen Vertreter dieser Gruppe von Neuropathien stellt die *Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies* (HNPP) dar. Im Falle der autosomal-dominanten HNPP des Menschen führt in circa 80 Prozent der Fälle eine Deletion von 1,5 Megabasen auf Chromosom 17p11.2 zu einer reduzierten Expression des PMP22-Proteins, einem Bestandteil des kompakten Myelins im PNS. In selteneren Fällen sind auch Punktmutationen des Pmp22-Gens beschrieben (Stogbauer et al. 2000). Mausmutanten mit einem heterozygoten Defekt des Pmp22-Gens entwickeln eine tomaculöse Neuropathie, die histologisch auch im zeitlichen Verlauf die HNPP des Menschen widerspiegelt (Adlkofer et al. 1997). Seltener werden Tomacula auch in Biopsien von CMT1B und CMT3 beobachtet, in denen Mutationen des Myelinsgens *Myelin protein zero* nachgewiesen wurden (Sander et al. 2000). Darüber hinaus zeigen auch immunologische Erkrankungen wie die „chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie“ (CIDP) und die „IgM-paraproteinämische Neuropathie“, die im Rahmen der verschiedenen IgM-Makroglobulinämien auftritt, histologisch Tomacula (Sander et al. 2000). Vermutet wird hierbei ein Zusammenhang durch die Entstehung von Autoantikörpern gegen Bestandteile des unkompaktem Myelins, wie beispielsweise *Myelin-associated glycoprotein* (MAG) (Chassande et al. 1998).

Gemeinsam ist diesen tomaculösen Neuropathien also eine Störung der Funktion von Genen, die für Bestandteile der Myelinscheide kodieren, sei es auf Basis von Genmutationen oder durch immunologische Vorgänge.

Ein denkbarer Zusammenhang zu den Pten-Mutanten ergibt sich, in Anbetracht der Regulation der Genexpression durch PTEN-abhängige Signalachsen wie dem PI3K-AKT-mTOR-Signalweg. Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 vermutet, könnte in den Pten-Mutanten ein verändertes Genexpressionsmuster verschiedener Myelinsgene zur Bildung der Tomacula beitragen. Zu bedenken ist dabei, dass die Formation der Tomacula keineswegs ein völlig unspezifisches Merkmal von Neuropathien darstellt. Beispielsweise entwickeln sich bei der CMT-Unterform *X-linked CMT* (CMTX) keine Tomacula, auch wenn hier durch Mutation des Connexin32-Gens ein wichtiger Bestandteil des unkompakten Myelins betroffen ist (Bergoffen et al. 1993). Die morphologischen Parallelen zu den tomaculösen Neuropathien könnten somit auf spezifische pathologische Genexpressionsmuster hindeuten, die sich im Vergleich der Pten-Mutanten mit den jeweiligen Mausmodellen für tomaculösen Neuropathien zeigen könnten. Im Fall der Pten-Mutanten trägt der mTOR-Signalweg zur Tomacula-Entstehung bei, denn seine teilweise Blockierung führte zu einer Reduktion Bildung von Tomacula (Goebbels et al. 2012). Ob vergleichbare therapeutische Ansätze auch im Falle der tomaculösen Neuropathien wirksam wären, ließe sich am jeweiligen Mausmodell testen. Neue Erkenntnisse hinsichtlich beteiligter Signalwege und Genexpressionsmuster könnten zu neuen Therapieansätzen führen, in denen beispielsweise durch *small-interfering RNA*, antikörperbasierte Therapiekonzepte oder sog. *small-molecules* eine gezielte Beeinflussung von Signalwegen und Genexpression in Neuropathie-Patienten genutzt werden könnten.

4.6 Schlussfolgerungen und Konsequenzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine histologische und molekularbiologische Charakterisierung von Mausmutanten mit einer konditionalen Inaktivierung des Pten-Gens in Schwannzellen und Oligodendrozyten (Pten-Mutanten) durchgeführt. Es konnten sowohl neue Informationen zur Entwicklungsbiologie der Schwannzelle als auch zur Pathophysiologie von verschiedenen Neuropathien des Menschen gewonnen werden.

Der pränatale konditionale Verlust der Lipidphosphatase PTEN in Schwannzellen *in vivo* führte zu einer nachweisbaren Anreicherung seines Substrates – des *second messenger* PIP3 – und damit zu einer Überaktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs. Es entwickelte sich ein drastischer histologischer Phänotyp hinsichtlich verschiedener beobachtbarer Stadien der Schwannzellentwicklung. Folgende Rückschlüsse können auf die Funktion der beeinflussten Signalwege und der Lipidphosphatase PTEN in Schwannzellen gezogen werden:

(1) Die beobachtete gleichmässige Hypermyelinisierung von Axonen mit einem Durchmesser $< 2 \mu\text{m}$ lässt darauf schließen, dass die Information des Axondurchmessers in der Schwannzelle unter anderem über den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg verarbeitet wird, um eine physiologische Myelindicke zu gewährleisten (siehe 4.2.1).

(2) Die Ausbildung von Tomacula und Myelinausfaltungen um Axone mit einem Durchmesser $> 2 \mu\text{m}$ lässt vermuten, dass die Homöostase der verschiedenen membrangebundenen Phosphatidylinositole in Regionen unkompakten Myelins eine wichtige Voraussetzung zur Bildung einer intakten Myelinscheide darstellt. Die korrekte Lokalisation der Lipidphosphatase PTEN in den einzelnen Myelinkompartimenten spielt dabei vermutlich eine wichtige Rolle (siehe 4.2.2 und 4.2.3).

(3) Auch während des *radial sorting* scheint die Aktivität des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs ein wichtiger Faktor im Rahmen der Entwicklung zu myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Schwannzellen zu sein. Möglicherweise wird durch axonalen Kontakt ein Schwellenwert der Signalaktivität überschritten, der die Bildung einer Myelinscheide um das jeweilige Axon auslöst. Dieser Schwellenwert würde in den Pten-Mutanten häufiger erreicht werden und die beobachtete ektopische Myelinisierung von normalerweise unmyelinisierten Axonen verursachen (siehe 4.3).

(4) In nicht-myelinisierenden Schwannzellen führt der Verlust von PTEN zur Bildung von multiplen Membranwicklungen um C-Faser-Axone und Kollagenbündel. Dies könnte auf ein intrinsisches Programm der Schwannzelle zur Ausbildung von Membranwicklungen hindeuten. Eine pathologische Anreicherung von PIP3 in Bereichen der Plasmamembran mit Überaktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs ist anscheinend ausreichend zur Initiierung dieses Programms, auch ohne spezifische axonale Signale (siehe 4.4).

Diese Ergebnisse könnten zu einem besseren Verständnis der Entwicklungsbiologie der Schwannzelle und insbesondere dem Prozess der Myelinisierung beitragen. In Studien zur axonalen Regeneration nach Neurotrauma wurde die notwendige Dedifferenzierung der Schwannzelle und insbesondere die Myelindicke nach Remyelinisierung durch ein autokrines und parakrines NRG1-Signal maßgeblich beeinflusst (Stassart et al. 2013). Analog dazu lässt der Phänotyp der Pten-Mutanten auf eine Schlüsselrolle des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs für Schwannzellendifferenzierung und Myelindicke schließen. Somit könnte dieser Signalweg, als möglicher intrazellulärer Vermittler von NRG1, ein zukünftiges Ziel zur Erforschung und Behandlung von peripheren Nervenläsionen sein.

Weiterhin ergibt ein Vergleich der Pten-Mutanten mit bereits beschriebenen Mausmodellen verschiedener hereditärer Neuropathien Anlass zu folgenden Schlussfolgerungen:

Die histologischen Gemeinsamkeiten von Pten-Mutanten und Mausmodellen der CMT4B weisen auf ein gestörtes Gleichgewicht der Phosphatidylinositole in den verschiedenen Myelinkompartimenten als möglichen gemeinsamen Pathomechanismus hin. Dieses gestörte Gleichgewicht von *second messenger*-Molekülen führt vermutlich, neben der lokalen Dysregulation von Membranwachstum, zu einer veränderten Aktivität verschiedener Signalkaskaden mit dem Resultat der pathologischen Myelinausfaltungen (siehe 4.5.1).

Aufbauend auf den hier vorliegenden Daten, führte in Folgeexperimenten unserer Arbeitsgruppe eine Behandlung der Pten-Mutanten mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin zu einer Reduktion dieser pathologischen Strukturen (Goebbels et al. 2012). Die Evaluation des Therapieprinzips der mTOR-Inhibition in Mausmodellen der CMT4B und HNPP wäre ein denkbarer nächster Schritt (siehe 4.5.1 und 4.5.2).

Im Gegensatz zur mTOR-Inhibition führte im Mausmodell der CMT1A eine axonale Überexpression von NRG1 Typ I zu einer Aktivitätssteigerung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs in Schwanzzellen mit dem positiven Resultat eines verminderten axonalen Verlustes (Fledrich et al. 2014). Dieses Beispiel zeigt, dass eine Modulation der Signalwege der Schwanzzelle – abhängig vom jeweiligen Pathomechanismus – zu unterschiedlichen Resultaten führen kann und weiterer Erforschung bedarf.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Informationen über die Funktion der Signalwege in Schwanzzellen können somit einen Beitrag zu aktuellen und zukünftigen Therapiemöglichkeiten für Neuropathien und periphere Neurotraumen leisten.

5 Zusammenfassung

In der Entwicklung des peripheren Nervensystems formen Schwannzellen eine Myelinscheide um Axone mit einem Durchmesser von mehr als 1 μm durch die Bildung multipler kompakter Membranschichten. Voraussetzung einer optimalen Nervenleitgeschwindigkeit ist dabei ein physiologisches Verhältnis der Dicke der Myelinscheide zu dem jeweiligen Axondurchmesser. Eine zentrale Rolle spielt dabei der axonale *EGF-like growth factor* NRG1 Typ III, der ErbB2/3-Rezeptoren der Schwannzelle bindet. Der PI3K-AKT-Signalweg ist ein bekannter intrazellulärer Effektor des ErbB2/3-Rezeptors und wurde bereits mit dem Prozess der Myelinisierung in Verbindung gebracht.

Um die spezifische Funktion des PI3K-AKT-Signalwegs in Schwannzellen zu erforschen, generierten wir mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems Mausmutanten, die eine zellspezifische Inaktivierung des Gens *Phosphatase and Tensin Homolog (Pten)* in myelinisierenden Gliazellen aufweisen (Pten-Mutanten). Der Verlust der Lipidphosphatase PTEN führte zu einer Anreicherung ihres Substrates, des *second messenger* Phosphatidyl-(3,4,5)-Trisphosphat (PIP3), und damit zu einer gesteigerten Aktivität des PI3K-AKT-Signalwegs in den Schwannzellen der Pten-Mutanten.

Wir beobachteten in den Pten-Mutanten eine ektopische Myelinisierung von unmyelinisierten C-Faser-Axonon sowie eine Hypermyelinisierung von Axonen bis 2 μm Durchmesser. Bei Axonen über 2 μm Durchmesser kam es zu Myelinausfaltungen und fokalen Hypermyelinisierungen (Tomacula) anliegend an Regionen des unkompakten Myelins (Paranodien und Schmidt-Lantermann-Inzisuren). Weiterhin bildeten die mutanten Remak-Schwannzellen unkompakte Membranwicklungen um nicht-myelinisierte C-Faser-Axone und um Kollagenfaserbündel aus („Remak-Myelin“). Sowohl in den Regionen unkompakten Myelins als auch in Remak-Schwannzellen konnte eine erhöhte Aktivität des PI3K-AKT-Signalwegs nachgewiesen werden.

Vermutlich setzt die Anreicherung von PIP3 mit Überaktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs in den mutanten Gliazellen einen zellautonomen Prozess der Umwicklung von Axonen in Gang. Die zusätzliche Bildung von „Remak-Myelin“ um Kollagenfasern, die keine Membranoberfläche besitzen, weist darauf hin, dass dieser Prozess nicht von einer bidirektionalen axo-glialen Kommunikation abzuhängen scheint.

Die beobachteten Tomacula und Myelinausfaltungen zeigten Ähnlichkeiten mit Mausmodellen für hereditäre Neuropathien des Menschen, wie HNPP und CMT4B. Wir vermuten, dass PTEN im unkompakten Myelin unkontrolliertes Membranwachstum verhindert und dass eine gestörte Balance von Phosphoinositiden einen Pathomechanismus von tomaculösen Neuropathien darstellt. Somit identifizieren wir den PI3K-AKT-Signalweg als ein mögliches Ziel zukünftiger Therapiekonzepte für hereditäre Neuropathien des Menschen.

6 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DIE ENTWICKLUNGSSTADIEN DER SCHWANNZELLE.....	3
ABBILDUNG 2: REGULATION DER SCHWANNZELL-ENTWICKLUNG DURCH NEUREGULIN1 TYP III.....	6
ABBILDUNG 3: REGULATION DER MYELINDICKE DURCH AXONALES NEUREGULIN1 TYP III.....	7
ABBILDUNG 4: DER PI3K-AKT -SIGNALWEG.....	9
ABBILDUNG 5: DIE STRUKTUR DES PTEN-PROTEINS.....	11
ABBILDUNG 6: KONDITIONALE INAKTIVIERUNG VON PTEN IN SCHWANNZELLEN DER PTEN-MUTANTEN	38
ABBILDUNG 7: GENOTYPISIERUNG UND NACHWEIS DER CRE-SPEZIFISCHEN DELETION IN DEN PTEN-MUTANTEN	39
ABBILDUNG 8: REDUKTION DER BANDINTENSITÄTEN VON PTEN IN DEN PTEN-MUTANTEN IM WESTERN-BLOT	40
ABBILDUNG 9: GESTEIGERTE AKTIVIERUNG DES PI3K-AKT-SIGNALWEGS IN DEN PTEN-MUTANTEN	41
ABBILDUNG 10: VERGRÖßERUNG DES NERVUS ISCHIADICUS DER PTEN-MUTANTEN	42
ABBILDUNG 11: ANZAHL VON MYELINISIERTEN AXONEN UND VON SCHWANNZELLEN	43
ABBILDUNG 12: EKTOPISCHE MYELINISIERUNG VON C-FASER-AXONEN IN DEN PTEN-MUTANTEN.....	44
ABBILDUNG 13: BILDUNG VON „REMAK-MYELIN“ IN DEN PTEN-MUTANTEN UND ZUNAHME DER AXONGRÖßE UNTER EINFLUSS DER PTEN-DEFIZIENTEN REMAK-SCHWANNZELLEN.....	45
ABBILDUNG 14: AKTIVE UMWICKLUNG VON KOLLAGENFASERN DURCH NICHT-MYELINISIERENDE SCHWANNZELLEN	46
ABBILDUNG 15: MYELINDICKE VON AXONEN MIT EINEM DURCHMESSER GRÖßER ALS 2 µM	47
ABBILDUNG 16: HYPERMYELINISIERUNG VON AXONEN MIT WENIGER ALS 2 µM DURCHMESSER	48
ABBILDUNG 17: FOKALE HYPERMYELINISIERUNG (TOMACULA) UND KOMMAFÖRMIGE MYELINAUSSTÜLPUNGEN (KOMMATA) IN DEN PTEN-MUTANTEN	49
ABBILDUNG 18: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER VERSCHIEDENEN FORMEN DES ABERRANTEN MYELINS DER PTEN-MUTANTEN.	50
ABBILDUNG 19: LOKALISATION DER TOMACULA DER PTEN-MUTANTEN AN PARANODIEN UND SCHMIDT-LANTERMANN-INZISUREN.	51
ABBILDUNG 20: MARKIERUNG VON PHOSPHORYLIERTEM AKT IN REGIONEN UNKOMPAKTEN MYELINS	52
ABBILDUNG 21: MARKIERUNG VON PHOSPHORYLIERTEM AKT IN NICHT-MYELINISIERENDEN SCHWANNZELLEN	53
ABBILDUNG 22: UNVERÄNDERTE VERTEILUNG VON DLG1 UND PAR3 IN REGIONEN UNKOMPAKTEN MYELINS.....	55

7 Literaturverzeichnis

- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995): Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet* **11**(3), 274-80
- Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1997): Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* **17**(12), 4662-71
- Aguayo AJ, Charron L, Bray GM (1976): Potential of Schwann cells from unmyelinated nerves to produce myelin: a quantitative ultrastructural and radiographic study. *J Neurocytol* **5**(8), 565-73
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7**(4), 261-9
- Awad A, Sar S, Barre R, Cariven C, Marin M, Salles JP, Erneux C, Samuel D, Gassama-Diagne A (2013): SHIP2 regulates epithelial cell polarity through its lipid product, which binds to Dlg1, a pathway subverted by hepatitis C virus core protein. *Mol Biol Cell* **24**(14), 2171-85
- Azzedine H, Bolino A, Taieb T, Birouk N, Di Duca M, Bouhouche A, Benamou S, Mrabet A, Hammadouche T, Chkili T (2003): Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma. *Am J Hum Genet* **72**(5), 1141-53
- Backer JM (2008): The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* **410**(1), 1-17
- Backman SA, Stambolic V, Suzuki A, Haight J, Elia A, Pretorius J, Tsao MS, Shannon P, Bolon B, Ivy GO (2001): Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* **29**(4), 396-403
- Backman SA, Ghazarian D, So K, Sanchez O, Wagner KU, Hennighausen L, Suzuki A, Tsao MS, Chapman WB, Stambolic V (2004): Early onset of neoplasia in the prostate and skin of mice with tissue-specific deletion of Pten. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6), 1725-30
- Behse F, Buchthal F, Carlsen F, Knappeis GG (1972): Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Electrophysiological and histopathological aspects. *Brain* **95**(4), 777-94
- Berger P, Niemann A, Suter U (2006): Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia* **54**(4), 243-57
- Berger P, Tersar K, Ballmer-Hofer K, Suter U (2011): The CMT4B disease-causing proteins MTMR2 and MTMR13/SBF2 regulate AKT signalling. *J Cell Mol Med* **15**(2), 307-15
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH (1993): Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* **262**(5142), 2039-42
- Birchmeier C, Nave KA (2008): Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* **56**(14), 1491-7
- Birck A, Ahrenkiel V, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P (2000): Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies. *J Invest Dermatol* **114**(2), 277-80
- Bolino A, Bolis A, Previtali SC, Dina G, Bussini S, Dati G, Amadio S, Del Carro U, Mruk DD, Feltri ML (2004): Disruption of Mtmr2 produces CMT4B1-like neuropathy with myelin unfolding and impaired spermatogenesis. *Journal of Cell Biology* **167**(4), 711-21

- Bolis A, Coviello S, Bussini S, Dina G, Pardini C, Previtali SC, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, Feltri ML (2005): Loss of Mtmr2 phosphatase in Schwann cells but not in motor neurons causes Charcot-Marie-Tooth type 4B1 neuropathy with myelin outfoldings. *Journal of Neuroscience* 25(37), 8567-77
- Bolis A, Coviello S, Visigalli I, Taveggia C, Bachi A, Chishti AH, Hanada T, Quattrini A, Previtali SC, Biffi A (2009): Dlg1, Sec8, and Mtmr2 regulate membrane homeostasis in Schwann cell myelination. *J Neurosci* 29(27), 8858-70
- Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT, Mirsky R, Jessen KR (2000): Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev Biol* 227(2), 545-57
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M (2001): The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15(1), 66-78
- Brockes JP, Lemke GE, Balzer DR, Jr. (1980): Purification and preliminary characterization of a glial growth factor from the bovine pituitary. *J Biol Chem* 255(18), 8374-7
- Bunge MB: Schwann cell regulation of extracellular matrix biosynthesis and assembly. In: Dyck PJ, Thomas PK, Low PA, Podulso JF (Hrsg.): *Peripheral neuropathy*. Saunders, Philadelphia 1993, 243-66
- Buonanno A, Fischbach GD (2001): Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11(3), 287-96
- Cai Z, Sutton-Smith P, Swift J, Cash K, Finnie J, Turnley A, Thompson PD, Blumbergs PC (2002): Tomacula in MAG-deficient mice. *J Peripher Nerv Syst* 7(3), 181-9
- Cantley LC (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573), 1655-7
- Carracedo A, Pandolfi PP (2008): The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27(41), 5527-41
- Chan JR, Jolicoeur C, Yamauchi J, Elliott J, Fawcett JP, Ng BK, Cayouette M (2006): The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science* 314(5800), 832-6
- Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distèche CM, Bird TD (1993): DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 72(1), 143-51
- Charcot JM, Marie P (1886): Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Méd (Paris)* 6, 97-138
- Charest PG, Firtel RA (2007): Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J* 401(2), 377-90
- Chassande B, Leger JM, Younes-Chennoufi AB, Bengoufa D, Maisonobe T, Bouche P, Baumann N (1998): Peripheral neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy: correlations between M-protein antibody activity and clinical/electrophysiological features in 40 cases. *Muscle Nerve* 21(1), 55-62
- Chen S, Rio C, Ji RR, Dikkes P, Coggeshall RE, Woolf CJ, Corfas G (2003): Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss. *Nat Neurosci* 6(11), 1186-93
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003): The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284(1), 54-65
- Cotter L, Ozcelik M, Jacob C, Pereira JA, Locher V, Baumann R, Relvas JB, Suter U, Tricaud N (2010): Dlg1-PTEN interaction regulates myelin thickness to prevent damaging peripheral nerve overmyelination. *Science* 328(5984), 1415-8
- Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J (2002): Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110(6), 737-49
- D'Antonio M, Droggiti A, Feltri ML, Roes J, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR (2006): TGFbeta type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *J Neurosci* 26(33), 8417-27

- Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (1998): Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature genetics* 19(4), 348-55
- Di Paolo G, De Camilli P (2006): Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443(7112), 651-7
- Donaldson HH, Hoke GW (1905): On the areas of the axis cylinder and medullary sheath as seen in cross sections of the spinal nerves of vertebrates. *J Comp Neurol Psychol* 15(1), 1-16
- Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR (1995): Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15(3), 585-96
- Dong Z, Sinanan A, Parkinson D, Parmantier E, Mirsky R, Jessen KR (1999): Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res* 56(4), 334-48
- Dyck PJ (1968): Peripheral neuropathy. Changing concepts, differential diagnosis and classification. *Med Clin North Am* 52(4), 895-908
- Edwards AM, Braun PE (1988): Gene expression of the central and peripheral nervous system myelin membrane 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in development. *Dev Neurosci* 10(2), 75-80
- Einheber S, Hannocks MJ, Metz CN, Rifkin DB, Salzer JL (1995): Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J Cell Biol* 129(2), 443-58
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7(8), 606-19
- Escurat M, Djabali K, Gumpel M, Gros F, Portier MM (1990): Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J Neurosci* 10(3), 764-84
- Esper RM, Loeb JA (2004): Rapid axoglial signaling mediated by neuregulin and neurotrophic factors. *J Neurosci* 24(27), 6218-27
- Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, Cabrini I, Taioli F, Malerba G, Bertolasi L, Rizzuto N (2007): Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton. *Brain* 130(Pt 2), 394-403
- Falls DL (2003): Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *J Neurocytol* 32(5-8), 619-47
- Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A (2002): Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol* 156(1), 199-209
- Feltri ML, Suter U, Relvas JB (2008): The function of RhoGTPases in axon ensheathment and myelination. *Glia* 56(14), 1508-17
- Feng W, Wu H, Chan LN, Zhang M (2008): Par-3-mediated junctional localization of the lipid phosphatase PTEN is required for cell polarity establishment. *J Biol Chem* 283(34), 23440-9
- Fernandez-Valle C, Gorman D, Gomez AM, Bunge MB (1997): Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with Schwann cell myelination. *J Neurosci* 17(1), 241-50
- Fledrich R, Stassart RM, Klink A, Rasch LM, Prukop T, Haag L, Czesnik D, Kungl T, Abdelaal TA, Keric N (2014): Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nat Med* 20(9), 1055-61
- Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, Avila RL, Kirschner DA, Macklin WB (2008): Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *Journal of Neuroscience* 28(28), 7174-83
- Friede RL, Bischhausen R (1982): How are sheath dimensions affected by axon caliber and internode length? *Brain Res* 235(2), 335-50
- Fukui K, Wada T, Kagawa S, Nagira K, Ikubo M, Ishihara H, Kobayashi M, Sasaoka T (2005): Impact of the liver-specific expression of SHIP2 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2) on insulin signaling and glucose metabolism in mice. *Diabetes* 54(7), 1958-67

- Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA (2002): Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* **109**(5), 611-23
- Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C (2000a): Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* **22**(11), 987-96
- Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, Charnay P, Birchmeier C (2000b): A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* **148**(5), 1035-46
- Gassama-Diagne A, Yu W, ter Beest M, Martin-Belmonte F, Kierbel A, Engel J, Mostov K (2006): Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nature cell biology* **8**(9), 963-70
- Ghislain J, Charnay P (2006): Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep* **7**(1), 52-8
- Goebbels S, Oltrogge JH, Kemper R, Heilmann I, Bormuth I, Wolfer S, Wichert SP, Mobius W, Liu X, Lappe-Siefke C (2010): Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J Neurosci* **30**(26), 8953-64
- Goebbels S, Oltrogge JH, Wolfer S, Wieser GL, Nientiedt T, Pieper A, Ruhwedel T, Groszer M, Sereda MW, Nave KA (2012): Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tomaculous neuropathy. *EMBO molecular medicine* **4**(6), 486-99
- Goldstein ME, House SB, Gainer H (1991): NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells. *Journal of Neuroscience Research* **30**(1), 92-104
- Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M, Scherer SS (1996): Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci* **16**(19), 6107-18
- Grossmann KS, Wende H, Paul FE, Cheret C, Garratt AN, Zurborg S, Feinberg K, Besser D, Schulz H, Peles E (2009): The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) directs Neuregulin-1/ErbB signaling throughout Schwann cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(39), 16704-9
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H (2001): Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* **294**(5549), 2186-9
- Grove M, Komiyama NH, Nave KA, Grant SG, Sherman DL, Brophy PJ (2007): FAK is required for axonal sorting by Schwann cells. *J Cell Biol* **176**(3), 277-82
- Guenard V, Rosenbaum T, Gwynn LA, Doetschman T, Ratner N, Wood PM (1995): Effect of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 on Schwann cell proliferation on neurites. *Glia* **13**(4), 309-18
- Guertin DA, Sabatini DM (2007): Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**(1), 9-22
- Harding AE: Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower motor neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Low PA, Podulso JF (Hrsg.): *Peripheral neuropathy*. Saunders, Philadelphia 1993, 1051-63
- Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T (2001): Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol* **18**(3), 493-7
- He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T (2007): PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* **39**(2), 189-98
- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K (1995): Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* **11**(2), 216-8

- Ho WH, Armanini MP, Nuijens A, Phillips HS, Osheroff PL (1995): Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem* 270(44), 26722
- Hoke A, Ho T, Crawford TO, LeBel C, Hilt D, Griffin JW (2003): Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci* 23(2), 561-7
- Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD (1992): Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256(5060), 1205-10
- Ishii A, Furusho M, Bansal R (2013): Sustained activation of ERK1/2 MAPK in oligodendrocytes and schwann cells enhances myelin growth and stimulates oligodendrocyte progenitor expansion. *J Neurosci* 33(1), 175-86
- Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirsoo M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoenath S, Grosveld F, Meijer D (2003): The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev* 17(11), 1380-91
- Jessen KR, Mirsky R (2005): The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6(9), 671-82
- Karlsson U, Schultz RL (1965): Fixation of the Central Nervous System from Electron Microscopy by Aldehyde Perfusion. I. Preservation with Aldehyde Perfusates Versus Direct Perfusion with Osmium Tetroxide with Special Reference to Membranes and the Extracellular Space. *J Ultrastruct Res* 12, 160-86
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD (2001): Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 615-75
- Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, Ikeuchi M, Nagy A, Mak TW, Nakano T (2003): Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development* 130(8), 1691-700
- Kohno T, Takahashi M, Manda R, Yokota J (1998): Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 22(2), 152-6
- Kuhlenbaumer G, Young P, Hunermund G, Ringelstein B, Stogbauer F (2002): Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies. *J Neurol* 249(12), 1629-50
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA (2003): Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33(3), 366-74
- Le Douarin N, Dulac C, Dupin E, Cameron-Curry P (1991): Glial cell lineages in the neural crest. *Glia* 4(2), 175-84
- Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J (2005): Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7), 2596-601
- Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, Mager GM, Gillian-Daniel AL, Wrabetz L, Svaren J (2005): Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 93(3), 737-48
- Lesche R, Groszer M, Gao J, Wang Y, Messing A, Sun H, Liu X, Wu H (2002): Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis* 32(2), 148-9
- Leslie NR, Batty IH, Maccario H, Davidson L, Downes CP (2008): Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene* 27(41), 5464-76
- Li G, Robinson GW, Lesche R, Martinez-Diaz H, Jiang Z, Rozengurt N, Wagner KU, Wu DC, Lane TF, Liu X (2002): Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Development* 129(17), 4159-70

- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R (1997): PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275(5308), 1943-7
- Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, Tang L, Hla T, Zeng R, Li L (2005): Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* 7(4), 399-404
- Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M (1997): Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16(1), 64-7
- Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, Sun H, Wu H (2000): Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol* 10(7), 401-4
- Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM (1999): SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev* 13(7), 786-91
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-75
- Lubetzki C, Demerens C, Anglade P, Villarroya H, Frankfurter A, Lee VM, Zalc B (1993): Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(14), 6820-4
- Luft JH (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 409-14
- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA (1991): DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66(2), 219-32
- Lyons DA, Pogoda HM, Voas MG, Woods IG, Diamond B, Nix R, Arana N, Jacobs J, Talbot WS (2005): *erbb3* and *erbb2* are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr Biol* 15(6), 513-24
- Madhunapantula SV, Robertson GP (2009): The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 22(4), 400-19
- Madrid R, Bradley WG (1975): The pathology of neuropathies with focal thickening of the myelin sheath (Tomaculous Neuropathy). Studies in the formation of the abnormal myelin sheath. *J Neurol Sci* 25, 415-48
- Maehama T, Dixon JE (1998): The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273(22), 13375-8
- Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, Eng C (1997): Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 16(4), 333-4
- Martenson RE, Deibler GE, Kies MW (1971): The occurrence of two myelin basic proteins in the central nervous system of rodents in the suborders Myomorpha and Sciuromorpha. *J Neurochem* 18(12), 2427-33
- Martin JR, Webster HD (1973): Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure, and axon relationships. *Dev Biol* 32(2), 417-31
- Martyn CN, Hughes RA (1997): Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62(4), 310-8
- Maurel P, Salzer JL (2000): Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *Journal of Neuroscience* 20(12), 4635-45
- Meili R, Sasaki AT, Firtel RA (2005): Rho Rocks PTEN. *Nat Cell Biol* 7(4), 334-5
- Meyer D, Birchmeier C (1995): Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378(6555), 386-90
- Meyer D, Yamaai T, Garratt A, Riethmacher-Sonnenberg E, Kane D, Theill LE, Birchmeier C (1997): Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124(18), 3575-86

- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004): Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304(5671), 700-3
- Morrissey TK, Levi AD, Nuijens A, Sliwkowski MX, Bunge RP (1995): Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5), 1431-5
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73
- Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J (2001): EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 30(2), 355-68
- Nave KA, Salzer JL (2006): Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16(5), 492-500
- Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H (2007): Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies--from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol* 3(8), 453-64
- Newbern J, Birchmeier C (2010): Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin Cell Dev Biol* 21(9), 922-8
- Norrmen C, Suter U (2013): Akt/mTOR signalling in myelination. *Biochem Soc Trans* 41(4), 944-50
- Novak N, Bar V, Sabanay H, Frechter S, Jaegle M, Snapper SB, Meijer D, Peles E (2011): N-WASP is required for membrane wrapping and myelination by Schwann cells. *J Cell Biol* 192(2), 243-50
- Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S (2004): Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination. *Journal of Neuroscience* 24(30), 6724-32
- Pannese E, Rigamonti L, Procacci P, Ledda M, Arcidiacono G, Frattola D (1987): An electron microscope study of quantitative relationships between axon and Schwann cell sheath in myelinated fibres of peripheral nerves. *Anat Embryol (Berl)* 175(4), 423-30
- Parkinson DB, Dong Z, Bunting H, Whitfield J, Meier C, Marie H, Mirsky R, Jessen KR (2001): Transforming growth factor beta (TGFbeta) mediates Schwann cell death in vitro and in vivo: examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGFbeta-mediated death to Schwann cell differentiation. *J Neurosci* 21(21), 8572-85
- Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U (2012): Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends in neurosciences* 35(2), 123-34
- Poliak S, Peles E (2003): The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 4(12), 968-80
- Previtali SC, Dina G, Nodari A, Fasolini M, Wrabetz L, Mayer U, Feltri ML, Quattrini A (2003): Schwann cells synthesize alpha7beta1 integrin which is dispensable for peripheral nerve development and myelination. *Mol Cell Neurosci* 23(2), 210-8
- Quarles RH (1983): Myelin-associated glycoprotein in development and disease. *Dev Neurosci* 6(6), 285-303
- Quattrone A, Gambardella A, Bono F, Aguglia U, Bolino A, Bruni AC, Montesi MP, Oliveri RL, Sabatelli M, Tamburrini O (1996): Autosomal recessive hereditary motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths: clinical, electrophysiologic, and genetic aspects of a large family. *Neurology* 46(5), 1318-24
- Rauktys A, Lee N, Lee L, Dabora SL (2008): Topical rapamycin inhibits tuberous sclerosis tumor growth in a nude mouse model. *BMC Dermatol* 8, 1
- Rebai T, Mhiri C, Heine P, Charfi H, Meyrignac C, Gherardi R (1989): Focal myelin thickenings in a peripheral neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Acta Neuropathol* 79(2), 226-32
- Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960): Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35, 313-23

- Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997): Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* **389**(6652), 725-30
- Runker AE, Kobsar I, Fink T, Loers G, Tilling T, Putthoff P, Wessig C, Martini R, Schachner M (2004): Pathology of a mouse mutation in peripheral myelin protein P0 is characteristic of a severe and early onset form of human Charcot-Marie-Tooth type 1B disorder. *J Cell Biol* **165**(4), 565-73
- Salzer JL, Williams AK, Glaser L, Bunge RP (1980): Studies of Schwann cell proliferation. II. Characterization of the stimulation and specificity of the response to a neurite membrane fraction. *J Cell Biol* **84**(3), 753-66
- Sander S, Ouvrier RA, McLeod JG, Nicholson GA, Pollard JD (2000): Clinical syndromes associated with tomacula or myelin swellings in sural nerve biopsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **68**(4), 483-8
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712), 1098-101
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995): Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* **15**(12), 8281-94
- Sheean ME, McShane E, Cheret C, Walcher J, Muller T, Wulf-Goldenberg A, Hoelper S, Garratt AN, Kruger M, Rajewsky K (2014): Activation of MAPK overrides the termination of myelin growth and replaces Nrg1/ErbB3 signals during Schwann cell development and myelination. *Genes Dev* **28**(3), 290-303
- Sherman DL, Krols M, Wu LM, Grove M, Nave KA, Gangloff YG, Brophy PJ (2012): Arrest of myelination and reduced axon growth when Schwann cells lack mTOR. *J Neurosci* **32**(5), 1817-25
- Simons M, Snaidero N, Aggarwal S (2012): Cell polarity in myelinating glia: from membrane flow to diffusion barriers. *Biochimica et biophysica acta* **1821**(8), 1146-53
- Simpson SA, Young JZ (1945): Regeneration of fibre diameter after cross-unions of visceral and somatic nerves. *J Anat* **79**(Pt 2), 48-65
- Snaidero N, Mobius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA (2014): Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* **156**(1-2), 277-90
- Soilu-Hanninen M, Ekert P, Bucci T, Syroid D, Bartlett PF, Kilpatrick TJ (1999): Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway. *J Neurosci* **19**(12), 4828-38
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**(1), 29-39
- Stassart RM, Fledrich R, Velanac V, Brinkmann BG, Schwab MH, Meijer D, Sereda MW, Nave KA (2013): A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. *Nature neuroscience* **16**(1), 48-54
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T (1997): Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**(4), 356-62
- Stewart HJ, Turner D, Jessen KR, Mirsky R (1997): Expression and regulation of alpha1beta1 integrin in Schwann cells. *J Neurobiol* **33**(7), 914-28
- Stiles B, Groszer M, Wang S, Jiao J, Wu H (2004): PTENless means more. *Dev Biol* **273**(2), 175-84
- Stogbauer F, Young P, Kuhlenbaumer G, De Jonghe P, Timmerman V (2000): Hereditary recurrent focal neuropathies: clinical and molecular features. *Neurology* **54**(3), 546-51
- Stokoe D (2001): Pten. *Curr Biol* **11**(13), R502
- Strachan T: *Molekulare Humangenetik*, 3. Auflage; Elsevier, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 2005

- Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H (1999): PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11), 6199-204
- Suter U (2007): Phosphoinositides and Charcot-Marie-tooth disease: new keys to old questions. *Cell Mol Life Sci* 64(24), 3261-5
- Suzuki A, Nakano T, Mak TW, Sasaki T (2008): Portrait of PTEN: messages from mutant mice. *Cancer Sci* 99(2), 209-13
- Syroid DE, Maycox PJ, Soilu-Hanninen M, Petratos S, Bucci T, Burrola P, Murray S, Cheema S, Lee KF, Lemke G (2000): Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. *J Neurosci* 20(15), 5741-7
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P (2005): Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47(5), 681-94
- Thorpe GH, Kricka LJ (1986): Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol* 133, 331-53
- Thurnherr T, Benninger Y, Wu X, Chrostek A, Krause SM, Nave KA, Franklin RJ, Brakebusch C, Suter U, Relvas JB (2006): Cdc42 and Rac1 signaling are both required for and act synergistically in the correct formation of myelin sheaths in the CNS. *Journal of Neuroscience* 26(40), 10110-9
- Tooth HH: The peroneal type of progressive muscular atrophy, Lewis, London 1886
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994): Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371(6500), 796-9
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4350-4
- Trapp BD, Itoyama Y, Sternberger NH, Quarles RH, Webster H (1981): Immunocytochemical localization of P0 protein in Golgi complex membranes and myelin of developing rat Schwann cells. *J Cell Biol* 90(1), 1-6
- Van Haastert PJ, Devreotes PN (2004): Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8), 626-34
- Verheijen MH, Chrast R, Burrola P, Lemke G (2003): Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev* 17(19), 2450-64
- Wanner IB, Guerra NK, Mahoney J, Kumar A, Wood PM, Mirsky R, Jessen KR (2006): Role of N-cadherin in Schwann cell precursors of growing nerves. *Glia* 54(5), 439-59
- Webster H, Favilla JT: Development of peripheral nerves. In: Dyck PJ (Hrsg.): *Peripheral neuropathy*. W.B. Saunders, Philadelphia 1984, 329-59
- Weinberg HJ, Spencer PS (1975): Studies on the control of myelinogenesis. I. Myelination of regenerating axons after entry into a foreign unmyelinated nerve. *J Neurocytol* 4(4), 395-418
- Wen D, Peles E, Cupples R, Suggs SV, Bacus SS, Luo Y, Trail G, Hu S, Silbiger SM, Levy RB (1992): Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 69(3), 559-72
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW (2000): Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25(1), 79-91
- Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL (1998): The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15587-91
- Xie J, Erneux C, Pirson I (2013): How does SHIP1/2 balance PtdIns(3,4)P2 and does it signal independently of its phosphatase activity? *Bioessays* 35(8), 733-43

-
- Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E (1994): Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. *Nat Genet* 8(3), 297-302
- Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS (2005): Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol* 168(4), 655-66
- Yu WM, Feltri ML, Wrabetz L, Strickland S, Chen ZL (2005): Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. *J Neurosci* 25(18), 4463-72
- Zhang J, Hochwald SN (2014): The role of FAK in tumor metabolism and therapy. *Pharmacol Ther* 142(2), 154-63

Danksagungen

Ich danke Prof. K.-A. Nave, PhD für sein Vertrauen und seine uneingeschränkte Unterstützung bei der wissenschaftlichen Konzeption der Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. med. M. Simons für die Organisation und Vertretung der Arbeit als Doktorvater.

Frau Dr. rer. nat. Sandra Goebels danke ich besonders für ihr Vertrauen, die umfassende Betreuung, Motivation und Hilfe in allen Belangen bei der Umsetzung der Arbeit sowie der daraus entstandenen Publikationen.

Ulrike Bode danke ich besonders für die Hilfe bei der molekularbiologischen Arbeit mit DNA und RNA, Western Blots, Genotypisierung der Versuchstiere sowie für ihre Hilfsbereitschaft und Beistand in allen Belangen des Laborlebens.

Den Kollegen der Abteilung Neurogenetik danke ich für unsere fachlichen Diskussionen und ihre methodischen Anregungen sowie auch die wichtige moralische Unterstützung. Insbesondere danke ich in diesem Zusammenhang Alexander Checker Pieper, Susanne Wolfers, Robert Kemper und Ingo Bormuth.

Frau Dr. rer. nat. W. Möbius und Torben Ruhwedel danke ich für die Unterstützung und Vertrauen in allen Belangen der Elektronenmikroskopie.

Annette Fahrenholz danke ich für die Unterstützung bei der histologischen Methodik.

Schanila Nawaz, PhD bin ich für die kritische Korrektur der Dissertation und für ihren liebevollen Beistand in allen Lebenslagen zu ewigem Dank verpflichtet.

Originalarbeiten:

Goebbels S *, **Oltrogge JH** *, Wolfer S, Wieser GL, Nientiedt T, Pieper A, Ruhwedel T, Groszer M, Sereda MW und Nave KA (2012): Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tomaculous neuropathy. *EMBO molecular medicine* 4(6): 486-99.

* **gleichberechtigte Erstautorschaft**

Goebbels S *, **Oltrogge JH** *, Kemper R *, Heilmann I, Bormuth I, Wolfer S, Wichert SP, Mobius W, Liu X, Lappe-Siefke C (2010): Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J Neurosci* 30(26): 8953-64.

* **gleichberechtigte Erstautorschaft**

Posterpräsentationen:

Oltrogge JH, Goebbels S, Bode U, Groszer M, Nave KA

„Focal hypermyelination in mice lacking PTEN in Schwann cells“

Cold spring harbor meeting „Glia in health an disease“, New York, USA, 2005.

Abstract

Schwann cells in the peripheral nervous system form the myelin sheath by wrapping multiple membrane layers around axons with a diameter greater than 1 μm . Such ensheathment of the axon is considered an important prerequisite for an optimal nerve conduction velocity. A factor considered crucial for Schwann cell development and the initiation of myelination is the axonal EGF-like growth factor NRG1 type III, which binds the ERB2/3 receptor on Schwann cells. The PI3K-AKT pathway is a known downstream effector of ERB2/3-activation and has already been associated with myelination.

To examine the role of PI3K-AKT signaling in Schwann cells, we generated mouse mutants by inactivating the gene *Phosphatase and Tensin Homolog (Pten)* in Schwann cells and oligodendrocytes using of the Cre/loxP-system (Pten-Mutants). The loss of the lipid-phosphatase PTEN resulted in an accumulation of its substrate, the second messenger Phosphatidyl-(3,4,5)-trisphosphate (PIP3), and consequently in an overactivation of the PI3K-AKT-pathway.

We observed an ectopic myelination of normally unmyelinated C-fiber axons as well as a hypermyelination of axons up to a diameter of 2 μm in the Pten-Mutants. Axons greater than 2 μm in diameter showed myelin outfoldings and focal hypermyelinations (Tomaacula) adjacent to regions of uncompact myelin (paranodal loops and Schmidt-Lantermann incisures). Additionally, mutant Remak Schwann cells formed uncompact membrane wrappings around normally unmyelinated C-fiber axons ('Remak-myelin') and even around collagen fibrils. An increased activity of the PI3K-AKT pathway could be detected in regions of uncompact myelin as well as in the Remak bundles of the Pten-Mutants.

We presume that the accumulation of PIP3 with the increased PI3K-AKT-signaling triggers a cell-autonomous membrane wrapping of axons by mutant glial cells. The observation of 'Remak-Myelin' around collagen fibrils, which lack any membrane surface, indicates that this wrapping seems not to be dependent on bidirectional axo-glial signaling.

The observed myelin outfoldings and Tomacula resembled hallmarks of mouse mutants for human hereditary neuropathies, like HNPP and CMT4B. We suggest that PTEN preserves regions of uncompact myelin against uncontrolled membrane growth and that a disturbed balance of PIP3 and other phosphoinositides might play a critical role in the pathology of different neuropathies. We therefore propose the PI3K-AKT-pathway as a possible target for future therapies against human hereditary neuropathies.